



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**“EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADABILIDAD DE  
DETERGENTES COMERCIALES CON EL MÉTODO DE  
PRUEBA PRESUNTIVA MEDIANTE LA NORMA ASTM D2667,  
EN EL LABORATORIO AQLAB, EN LA CIUDAD FRANCISCO  
DE ORELLANA”**

Trabajo de titulación  
TIPO: PROYECTO TÉCNICO

Presentado para optar el grado académico de:  
**INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL**

**AUTORA: JESSICA ALEXANDRA CHINKIM VEGA**  
**TUTORA: DRA. YOLANDA DOLORES DÍAZ HEREDIA.**

Orellana – Ecuador  
2017

**©2017, Jessica Alexandra Chinkim Vega.**

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el derecho de autor.

## **DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD**

Yo, Jessica Alexandra Chinkim Vega, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autora, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba, 12 de diciembre de 2017

**Jessica Alexandra Chinkim Vega**

220011841-8

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS**

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El proyecto técnico: EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADABILIDAD DE DETERGENTES COMERCIALES CON EL MÉTODO DE PRUEBA PRESUNTIVA MEDIANTE LA NORMA ASTM D2667, EN EL LABORATORIO AQLAB, EN LA CIUDAD FRANCISCO DE ORELLANA, de responsabilidad de la Srta. Jessica Alexandra Chinkim Vega, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

**NOMBRE**

**FIRMA**

**FECHA**

DRA. YOLANDA DOLORES DÍAZ HEREDIA.

**DIRECTORA DEL TRABAJO DE  
TITULACIÓN**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

DR. GERARDO EMILIO MEDINA RAMÍREZ

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Yo, Jessica Alexandra Chinkim Vega, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este trabajo de titulación y el patrimonio intelectual del trabajo de titulación pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

**Jessica Alexandra Chinkim Vega**

220011841-8

## **DEDICATORIA**

La presente tesis refleja el esfuerzo, dedicación, perseverancia, y la meta alcanzada en mi vida, por ello quiero dedicarla:

A Dios porque ha estado conmigo en cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar. Con todo mi amor a mis padres y hermanos, que simplemente son todo en mi vida y me han dado un ejemplo de lucha y perseverancia.

A una persona muy importante en mi vida, que de forma incondicional entendió mis alegrías y tristezas, por compartir tantos años de lindos y duros momentos, quien ocupa un gran espacio en mi corazón, Elio.

**Jessica Chinkim.**

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios por darme su amor, protección y fortaleza cada instante de mi vida. A mis padres, quienes, con su incondicional apoyo, me ayudaron a conseguir la culminación de mis estudios, a mis hermanos por todo el cariño y contribución.

Agradezco también a Elio, por su apoyo y ayuda incondicional, quien también estuvo conmigo en esos buenos y malos momentos dándome fuerzas y valor para no claudicar en la consecución de este logro en mi vida.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo en especial a la Dra. Yolanda Díaz Heredia en calidad de Directora de Tesis por el apoyo brindado en la elaboración del trabajo investigativo y de la misma manera al Dr. Gerardo Medina por su valiosa colaboración y asesoramiento para el desarrollo de este trabajo.

Al Laboratorio AQLAB, personal Técnico y Administrativo mismos que brindaron el auspicio, contribución y apertura total de las instalaciones para la realización de esta investigación.

Agradezco también a mis profesores, compañeros y amigos, quienes también estuvieron conmigo en el transcurso de ésta carrera universitaria.

**Jessica Chinkim**

## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN.....</b>	<b>XV</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>XVI</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>4</b>
<b>1. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>4</b>
1.1 DETERGENTES	4
1.1.1 <i>Ingredientes de los detergentes.....</i>	4
1.1.2 <i>Tipos de detergentes .....</i>	5
1.1.2.2 <i>Tensoactivos no iónicos .....</i>	9
1.1.2.3 <i>Tensoactivos catiónicos .....</i>	10
1.2 INTERACCIÓN DE LOS CONTAMINANTES Y SURFACTANTES EN EL AGUA	10
1.2.1 <i>Eutrofización.....</i>	11
1.2.2 <i>Medidas de control .....</i>	11
1.2.3 <i>Control biológico.....</i>	11
1.3 LEGISLACIÓN AMBIENTAL	12
1.4 NORMAS ASTM	13
1.4.1 <i>Norma ASTM D2667 Método de Prueba Estándar para Biodegradabilidad de Alquil Benceno Sulfonato Lineal .....</i>	13
1.4.2 <i>Norma ASTM D2330 Método de Prueba Estándar para Sustancias Activas al Azul de Metileno. ....</i>	14
1.4.2.2 <i>Interferencias.....</i>	14
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>16</b>
<b>2 METODOLOGÍA .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 MARCO METODOLÓGICO .....</b>	<b>16</b>
2.1.1 <i>Tipo y diseño de la investigación.....</i>	16
2.1.2 <i>Localización geográfica de la investigación.....</i>	16
2.1.3 <i>Unidad de análisis .....</i>	17
2.1.4 <i>Técnicas de recolección de datos.....</i>	17
2.1.5 <i>Técnicas e instrumentos analíticos .....</i>	17
2.1.6 <i>Condiciones ambientales y conservación de las muestras.....</i>	19
2.2 DISEÑO EXPERIMENTAL	19
2.2.1 <i>Selección de detergentes comerciales.....</i>	19
2.2.2 <i>Curva de calibración .....</i>	19
2.2.3 <i>Muestra de agua de río.....</i>	20
2.2.4 <i>Muestra de lodos activos .....</i>	20



2.2.5	<i>Material de Referencia Certificado ATCC 25922 Escherichia coli.....</i>	21
2.2.6	<i>Preparación de las soluciones de detergentes. ....</i>	26
2.2.7	<i>Método de Prueba Estándar para Biodegradabilidad de Alquil Benceno Sulfonato, ASTM D2667 .....</i>	27
2.2.8	<i>Método de Prueba Estándar para Sustancias Activas de Azul de Metileno, ASTM D2330.....</i>	30
<b>CAPÍTULO III.....</b>		<b>33</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>33</b>
3.1	OBTENCIÓN DE RESULTADOS.	33
3.2	DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.	45
<b>CONCLUSIONES .....</b>		<b>47</b>
<b>RECOMENDACIONES .....</b>		<b>48</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>		
<b>ANEXOS</b>		

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2: Determinación de <i>E. coli</i> en el agua de río.....	20
Tabla 2-2: Determinación de <i>E. coli</i> en Lodo Activo .....	20
Tabla 3-2: Control de calidad de <i>E. coli</i> , en los inóculos para la biodegradabilidad. ....	26
Tabla 4-2: Peso y volumen de aforo empleado para el ensayo de tensoactivos.....	26
Tabla 5-2: Composición del medio de cultivo o medio basal.....	27
Tabla 6-2: Preparación de la curva de calibración .....	30
Tabla. 1-3: Prueba de biodegradabilidad con inóculo agua de río (primer ensayo).....	34
Tabla. 2-3: Prueba de biodegradabilidad con inóculo agua de río (segundo ensayo). ....	35
Tabla. 3-3: Prueba de biodegradabilidad con inóculo agua de río (tercer ensayo). ....	36
Tabla. 4-3: Prueba de biodegradabilidad con inóculo de lodos activos (primer ensayo).....	37
Tabla. 5-3: Prueba de biodegradabilidad con inóculo de lodos activos (segundo ensayo). ....	38
Tabla. 6-3: Prueba de biodegradabilidad con inóculo de lodos activos (tercer ensayo). ....	39
Tabla. 7-3: Prueba de biodegradabilidad con inóculo cepa ATCC 25922 (primer ensayo).....	40
Tabla. 8-3: Prueba de biodegradabilidad con inóculo cepa ATCC 25922 (segundo ensayo). ....	41
Tabla. 9-3: Prueba de biodegradabilidad con inóculo cepa ATCC 25922 (tercer ensayo). ....	42
Tabla. 10-3: Resumen de los resultados obtenidos con los inóculos y tensoactivos ensayados. ....	43

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-2. Mapa de ubicación de AqLab Laboratorio. ....	17
Figura 2-2: Comparación visual de la escala McFarland .....	24
Figura 3-2: Diluciones sucesivas para la determinación de la cepa de referencia ATCC 25922. ....	25

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-3:</b> Porcentaje de biodegradación con el inóculo de descarga en río.	43
<b>Gráfico 2-3:</b> Porcentaje de biodegradación con el inóculo de lodos activos.	44
<b>Gráfico 3-3:</b> Porcentaje de biodegradación con el inóculo de cepa de <i>E. coli</i> .	44

## ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo A. Registro fotográfico de las actividades realizadas
- Anexo B. Curva de Calibración para determinar la concentración de tensoactivos en mg/L
- Anexo C. Registro del control de temperatura en las condiciones específicas durante la incubación (Primer Ensayo)
- Anexo D. Registro del control de temperatura en las condiciones específicas durante la incubación (Segundo ensayo)
- Anexo E. Registro del control de temperatura en las condiciones específicas durante la incubación (Tercer ensayo)
- Anexo F. Certificado de LAS estándar de 60mg/l
- Anexo G. Certificado de la cepa de referencia certificado ATCC 25922 de *E. coli*
- Anexo H. Manual de procedimiento para determinar la biodegradabilidad de detergentes

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

LAS	Alquil Sulfonatos Lineal
MBAS	Sustancias Activas al Azul de Metileno (traducido del inglés)
SAAM	Sustancias Activas al Azul de Metileno.
ASTM	Asociación Americana de Ensayo de Materiales
INEN	Instituto Nacional Ecuatoriano de Normalización.
SAE	Servicio de Acreditación Ecuatoriana
NTE	Norma Técnica Ecuatoriana
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ITO	Instructivo Técnico Operativo
ITE	Instructivo Técnico de Ensayo
ITU	Instructivo Técnico de Uso
MV	Material Volumétrico
EFQ	Equipo Físico Químico
EMB	Equipo Microbiológico
SM	Métodos Estándar

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la biodegradabilidad de detergentes comerciales con el método de prueba presuntiva mediante la norma ASTM D2667, en el laboratorio Aqlab, en la ciudad Francisco de Orellana. Se realizó una revisión bibliográfica de la norma INEN, los métodos ASTM D2667 y ASTM D2330. Mediante el método ASTM D2667 se seleccionó el ensayo presuntivo, se comparó la eficiencia de biodegradación de detergentes comerciales aplicando la cepa ATCC 25922 (*Escherichia coli*), lodos activos y agua de río, en soluciones de detergentes comerciales sólidos y líquidos ensayados, las cuales se mantuvieron durante ocho días de incubación con agitación continua de los matraces. A continuación se procedió a aplicar el método ASTM D2330, este método se utilizó en el día inicial y en el octavo día de incubación, el cual determinó la reducción en el contenido de tensoactivo en mg/l en los detergentes ensayados, expresado en fracción de masa en porcentaje mínimo al 90% de biodegradabilidad, cumpliendo con el requisito de la norma INEN. Se elaboró un manual de procedimiento para el estudio de biodegradabilidad de detergentes. Se realizaron tres ensayos por repeticiones de cada inóculo utilizado: Cepa ATCC 25922 (*E.coli*), lodos activos y agua de río, el medio de cultivo microbiano y los tensoactivos. Se concluye mediante la comparación de la eficiencia de biodegradación de los inóculos, que la cepa ATCC 25922 (*E. coli*), es el más eficiente con resultados de 86 a 99 % de biodegradabilidad. De los tres tensoactivos sólidos y líquidos ensayados, el detergente C en sólido que se comercializa en el mercado como producto biodegradable tuvo una biodegradabilidad del 98%. Se recomienda preparar los reactivos para la incubación y extracción el mismo día del ensayo, para asegurar la calidad de resultados ya que estas soluciones no son muy estables.

**Palabras Clave:** <BIOTECNOLOGÍA>, <MICROBIOLOGÍA>, <BIODEGRADABILIDAD>  
<ASTM D2667 (MÉTODO)> < ASTM D2330 (MÉTODO)> <TENSOACTIVOS>  
<DETERGENTES COMERCIALES> <SUSTANCIAS ACTIVAS AL AZUL DE METILENO> < INCUBACIÓN DE MICROORGANISMOS>

## SUMMARY

The objective of this work was to evaluate the biodegradability of commercial detergents with the presumptive test method by the ASTM D2667 standard, in the AqLab laboratory, in the Francisco de Orellana city. A bibliographic review was carried out of the ASTM D2667 and ASTM D2330 methods of the INEN specification. By using the method ASTM D2667 the presumptive test was selected, the biodegradation efficiency was compared of commercial detergents applying strain ATCC 25922 (*Escherichia coli*), active sludges and river water, in solutions of commercial solid and liquid detergents tested, which were maintained during eight days of incubation with the continuous shaking of the flasks. Then proceeded to apply the method ASTM D2330, this method was used on the initial day and on the eighth day of incubation, which determined the reduction in the content of surfactant in mg / l in the tested detergents, it was expressed in fraction mass in a minimum percentage of 90% biodegradability, complying with the requirement of the INEN standard. A procedure manual was elaborated for the study of biodegradability of detergents. Three tests were performed by repetitions of each inoculum used: ATCC25922 strain (*E. coli*), active sludges and river water, the microbial culture medium and surfactants. It is concluded through the comparison of the biodegradation efficiency of the inoculums, which ATCC 25922 strain (*E. coli*) is the most efficient with results from 86 to 99% biodegradability, which ATCC 25922 strain (*E. coli*) is the most efficient with results from 86 to 99% biodegradability. Of the three surfactant solids and tensoactivos liquids tested, the detergent C in solid that is commercialized on the market as a biodegradable product had a biodegradability of 98%. It is recommended to prepare the reagents for incubation and extraction on the same day of the trial, to ensure the quality of results since these solutions are not very stable.

**Keywords:** <BIOTECHNOLOGY>, <MICROBIOLOGY>, <BIODEGRADABILITY>  
<ASTM D2667 (METHOD)> <ASTM D2330 (METHOD)> < SURFACTANTS >  
<COMMERCIAL DETERGENTS> <ACTIVE SUBSTANCES TO BLUE METHYLENE>  
<INCUBATION OF MICROORGANISMS>



## INTRODUCCIÓN

Los detergentes constituyen un grave problema de contaminación ambiental ya que además de contaminar suelos y cuerpos acuáticos superficiales, también llegan a mantos freáticos. Los sistemas de tratamiento convencional de aguas residuales, únicamente logran un bajo porcentaje de eliminación. En términos generales, los detergentes presentes en las aguas residuales son separados mediante procesos de formación de espuma y decantación, siendo enviados a canaletas laterales que eventualmente confluyen con las aguas residuales que no son tratadas.

Los detergentes son sustancias que se utilizan para limpiar y se disuelven en agua, éstas aguas van a parar como residuos a los ríos, lagos o se infiltran bajo tierra contaminándolos lo que provoca un proceso de eutrofización, lo cual dificulta la potabilización del agua para el consumo humano.

Los detergentes son compuestos regulados, cuya concentración debe ser reducida antes de ser descargados en cuerpos acuáticos y terrestres receptores. Algunos tensoactivos, los cuales conforman un detergente, no forman espumas, por lo que son preferidos para ser empleados en superficies duras. No obstante, al ser depositados en agua, tienden a formar ceras de bajo punto de fusión, lo que dificulta la depuración del agua residual. Asimismo, al combinarse con otras sustancias, como el nonilfenol, forma compuestos tóxicos aumentando así la dificultad para su biodegradación.

El método de ensayo ASTM D2667, está designado para determinar si el sulfonato contenido en el agua se reducirá en su concentración por los métodos usuales de tratamiento para que sea descargado de forma segura al ambiente sin tratamiento adicional. Si la reducción del surfactante en la prueba presuntiva es igual o superior al 90%, se considera que el material es biodegradable adecuadamente sin más pruebas.

## **Justificación del proyecto**

En la actualidad la contaminación de los ecosistemas acuáticos se ha incrementado de manera alarmante debido a las descargas de aguas residuales no tratadas de origen urbano e industrial. Asociados a estos vertidos se encuentran contaminantes orgánicos como los detergentes, cuya presencia en el medio receptor puede ocasionar problemas de toxicidad a la biota acuática. Además, pueden ocasionar problemas de eutrofización y problemas graves para la salud humana.

Debido a la necesidad de los clientes de AqLab y a la regulación ambiental nacional vigente, el laboratorio AqLab considera que al no tener implementado un método de análisis con el cual se determine la biodegradabilidad del tensoactivo para los detergentes de uso doméstico, se realizó una técnica de ensayo y evaluación de la biodegradabilidad de detergentes comerciales aplicando la prueba presuntiva mediante el método ASTM D2667, el cual determina la biodegradación de tensoactivos ensayados en fracción de masa expresada en porcentaje, este método toma referencia a la norma NTE INEN 849, que establece los requisitos que debe cumplir el detergente en polvo sintético, líquido y barras para su uso, lo cual es de alto interés para el cumplimiento de la normativa ambiental.

Mediante este trabajo, se determinó el porcentaje de biodegradabilidad del tensoactivo en detergentes comerciales con la prueba presuntiva, utilizando los métodos de pruebas estándares ASTM D2667 y ASTM D2330.

## OBJETIVOS

### *Objetivo General*

Evaluar la biodegradabilidad de detergentes comerciales con el método de prueba presuntiva mediante la norma ASTM D2667, en el laboratorio AqLab, en la ciudad Francisco de Orellana.

### *Objetivos Específicos*

- Comparar la eficiencia para la biodegradación de detergentes comerciales aplicando la cepa ATCC25922 (*Escherichia coli*), lodos activos y agua de río.
- Determinar la biodegradabilidad de detergentes comerciales sólidos y líquidos.
- Elaborar un manual de procedimiento para el estudio de biodegradabilidad de detergentes.

## CAPÍTULO I

### 1. MARCO TEÓRICO

#### 1.1 Detergentes

Los detergentes son un grupo de moléculas capaces de modificar las propiedades interfaciales de los líquidos (acuosos o no acuosos) en los cuales están presentes. Las propiedades de estas moléculas residen en su carácter anfifílico, es decir, que cada molécula de surfactante tiene una parte hidrofílica y una parte hidrofóbica o lipofílica. (Hutzinger O., 2008, p. 12)

La higiene era un objetivo de la humanidad, mucho antes de que existiera la base científica para definir cómo se podía lograr la higiene. Muchas tentativas tempranas, tales como el edificio de paredes, el uso de humo y de fuego en los rituales, eran tentativas fracasadas para crear condiciones higiénicas. Los detergentes eran usados para limpiar el cuerpo, las telas en contacto con el cuerpo, los utensilios para comer, etc. ahora proporcionan esa higiene de una manera conveniente. Se considera que el consumidor responde a una limpieza insatisfactoria añadiendo esfuerzo, como pasos de lavado adicionales, el uso de productos auxiliares o una mayor temperatura de lavado. (Schick Martin., 2012, p. 2)

##### *1.1.1 Ingredientes de los detergentes*

Generalmente los detergentes tienen las siguientes características:

- pH neutro para que los colores, las fibras y los materiales no se dañen.
- No deben producir demasiada espuma, ya que la solución de detergente se rocía y se retira inmediatamente. (Bruze Guy., 2008, p. 25)

##### *1.1.1.1 Enzimas*

Son proteínas capaces de eliminar compuestos presentes en la suciedad, y éstas se han convertido en un componente importante de los detergentes. Los detergentes incorporan un cóctel de enzimas para hidrolizar la proteína y el almidón. Las enzimas celulolíticas también pueden ser introducidas para minimizar la pérdida de color a la tela después de múltiples lavados y para reducir el deslucimiento de algodón. (Waldhoff Heinrich & Spilker Rüdiger., 2010, p. 45)

### *1.1.1.2 Aditivos*

Es a menudo cierto que el color y el perfume no contribuyen a los aspectos técnicos del rendimiento. El consumidor que compra un producto, primero ve el empaquetado, el color del producto, y huele la fragancia. (Waldhoff Heinrich & Spilker Rüdiger., 2010, p. 47)

## **1.1.2 Tipos de detergentes**

### *1.1.2.1 Tensoactivos aniónicos*

Un surfactante consiste esencialmente en un grupo hidrofóbico y un grupo hidrofílico, los aniones comunes son sulfonato y sulfato, raramente fosfato. A continuación, se enumeran algunos de los tipos de surfactantes aniónicos comúnmente utilizados: (Hayes Douglas, et al., 2009, p. 213)

#### *1.1.2.1.1 Alquil sulfonatos (SAS)*

Los sulfonato alifáticos de la parafina son normalmente mezclas de alquilsulfonatos secundarios, de ahí la abreviatura SAS. La cadena alquill, normalmente C<sub>14</sub> a C<sub>18</sub>, es lineal y el grupo -SO<sub>3</sub> se coloca al azar a lo largo de la cadena. Así el C<sub>14</sub> alquil sulfonato es una mezcla de los seis isómeros 2, 3, 4, 5, 6 y 7-sulfotetradecano. (Hayes Douglas, et al., 2009, p. 214) (Zoller Uri., 2012, p. 166)

- Usos y aplicaciones

Los alquilsulfonatos se utilizan en detergentes líquidos, a menudo se combinan en champús concentrados. No son muy utilizados en forma de polvo puesto que no es fácil su incorporación, aunque la adición del sulfonato de tolueno de sodio y de la silicona coloidal puede superar esto.

Los alquilsulfonatos, son buenos agentes mercerizados y se utilizan como aditivos de la materia textil y cuero. Debido a su estabilidad, los alquilsulfonatos se pueden utilizar en preparaciones alcalinas industriales para la limpieza de metales, chorros de vapor y baños de decapado. (Zoller Uri, 2012, p. 166)

#### *1.1.2.1.2 Alquil aril sulfonados (LAS)*

Son cadenas alquil, generalmente son una mezcla de 10 a 15 átomos de carbono, pero principalmente C<sub>11</sub> y C<sub>12</sub>, unidos al anillo del benceno en la posición del grupo de sulfonato, SO<sub>3</sub>H o SO<sub>3</sub>Na.

Los surfactantes de tipo alquil aril, son los más utilizados ya que tienen la efectividad de un excelente detergente, son de bajo costo puesto que se hace de materiales fácilmente disponibles y sus formulaciones tienen características físicas atractivas. (Schwuger M, 1997, p. 55)

- Usos y aplicaciones

Los alquil aril sulfonados son utilizados como agentes de limpieza en detergentes en polvo y líquidos de lavado de grado resistente. Sus propiedades de limpieza son excelentes para este propósito y también son de costos relativamente bajos. Los alquil aril sulfonados utilizan sal de sodio como único surfactante en una formulación o en conjunción con otros tensoactivos aniónicos, no iónicos o catiónicos. Algunos usos de la sal de sodio son las preparaciones secas de tensoactivo activador tales como polvos de fregado y bloques suspendidos usados para la limpieza de lavamanos. Otros usos industriales de la sal de sodio son en agroquímicos, textiles e industrias cementeras. (Schwuger M., 1997, p. 58)

Cuando el sodio es sustituido por otros cationes, las propiedades de la sal resultante son convenientes para el uso como emulsor en formulaciones de pesticidas; en tintorerías, detergentes, agentes desengrasantes para la limpieza de metales, geles de limpieza manual, cosméticos de limpieza, champú de coche, baños de burbuja. (Schwuger M., 1997, p. 60)

- LAS en el Ambiente.

Las rutas al ambiente de los alquil aril sulfonados, como en la mayoría de los productos químicos varían, siendo la principal ruta a través de plantas de tratamientos de aguas residuales, donde son llevadas a tratamiento físico y biológico, siendo estos efluentes descargados a ríos. Otras rutas son descargas directas de aguas residuales domesticas a ríos, lagos y mares, produciendo así su deterioro. (Zoller Uri, 2012, p. 216)

#### *1.1.2.1.3 Alquil sulfatos (AS)*

La mayoría de los alquil sulfatos (AS) son empleados en lavandería, y otros productos son los alquil sulfatos primarios lineales (LPAS), pero también se utilizan algunos sulfatos secundarios lineales y ramificados (LSA). (Zoller Uri, 2012, p. 319)

El grupo de forma hidrofóbico contiene generalmente 12 y 18 átomos de carbono, aunque los ésteres del C8 y C10 se utilizan como humectantes y agentes que hacen espuma. El producto normal es la sal de sodio, pero los productos que contienen otros cationes, se producen

incluyendo amonio, magnesio (mono, di, tri-etanolamina) y el (ciclohexilamina). (Zoller Uri, 2012, p. 20)

Los alquil sulfatos primarios lineales (LPAS) comerciales contienen una gama de homólogos que reflejan los precursores de ácidos grasos naturales. Sin embargo, los productos supuestamente puros vendidos por las compañías, por ejemplo "dodecil sulfato de sodio" contienen con frecuencia grandes cantidades de homólogos con excepción del sugerido por la etiqueta. Debido al método de producción de sulfatos secundarios, el grupo de sulfato se encuentra en todas las posiciones a lo largo de la cadena en el alcano, excepto en los extremos. (Zoller Uri, 2012, p. 21)

- Usos y aplicaciones

Los alquil sulfatos se han utilizado principalmente como agentes de lavado de telas a base de lana y como ingredientes activos en lavandería de trabajo liviano y pesado. Son también ampliamente utilizados en una variedad de productos como: cremas, champús de cabello, antiácidos, cosméticos y en ciertos alimentos, sin ninguna indicación de peligros para la salud del ser humano. En algunas formas se utilizan como emulsionantes para insecticidas y en tintas de impresiones. (Schick Martin., 2012, p. 312)

- AS en el ambiente

Los alquil sulfatos se han reconocido durante mucho tiempo por su fácil biodegradación; el alquil sulfato lineal primario (LPAS) experimenta la biodegradación primaria completa dentro de algunos días, a veces dentro de un día, durante el movimiento o la autodepuración de los ríos. Los compuestos secundarios moderadamente ramificados de alquil sulfato, también son muy fácilmente biodegradables, pero los ésteres de sulfato más ramificados se degradan a tasas considerablemente más bajas de concentración; los productos lineales comerciales contienen a menudo cantidades indefinidas de impurezas no lineales, que podrían hacer el producto "lineal", que parecen ser menos degradables de lo real. (Zoller Uri, 2012, p. 30) (Schick Martin., 2012, p. 315)

Los alquil sulfatos primarios lineales (LPAS) exceden a todos los otros tensoactivos aniónicos en la tasa de biodegradación primaria que indica la distribución generalizada de enzimas sulfatasa microbiana, causando un efecto negativo sobre bacterias, algas, invertebrados y otros organismos acuáticos. (Zoller Uri, 2012, p. 36)

#### 1.1.2.1.4 Alquil éter sulfato (AES)

Los alquil éter sulfatos, o alquil etoxi sulfatos, son los ésteres de sulfato primario derivado del alquil etoxilados. Estos alcoholes levemente etoxilados son más complejos, puesto que el contenido del óxido de etileno (EO) es solamente una porción media y apreciable del alcohol. Aproximadamente el 25% permanece inactivo cuando se agregan 2 moles de óxido de etileno y 18% para 3 moles. Así, el producto sulfatado contendrá algún alquil sulfato (AS). (Zoller Uri, 2012, p. 39) (Schick Martin., 2012, p. 321)

- Usos y aplicaciones

Los alquil éter sulfatos se utilizan en combinaciones con otros tensoactivos aniónicos y surfactantes no iónicos, en lavavajillas de uso doméstico. Además, se utilizan para aumentar el poder de detergentes líquidos basados en n-parafina sulfonato; sobre el 20% del total de la materia activa es sustituido por alquil éter sulfatos.

Los alquil éter sulfatos, especialmente las sales de monoetanolamina, se utilizan en champús para cabello, baños de burbujas y preparaciones de baño de ducha. Se utilizan con fluorosurfactantes en la producción de espumas de ducha, contra incendios de alta expansión. Mezclas de "cortes" especiales de ácido graso. Los alquil éter sulfatos se utilizan para producir champús para bebés y niños y también en la industria cosmética en maquillaje y lociones del cuerpo. (Zoller Uri, 2012, p. 39)

- Los alquil éter sulfatos en el ambiente.

Los alquil éter sulfatos son fácilmente biodegradables, tanto en los tratamientos aeróbicos como anaeróbicos, está claro que los alquil éter sulfatos disponibles en el mercado como surfactantes también se mineralizan fácilmente a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O, pero los alquil éter sulfatos tienden a ser ligeramente más resistente, existen especies de bacterias que pueden degradar los alquil éter sulfatos. (Zoller Uri, 2012, p. 57) (Schick Martin., 2012, p. 334)

#### 1.1.2.1.5 Sulfonatos $\alpha$ -Olefinas (AOS)

Los sulfonatos  $\alpha$ -olefinas se fabrican a partir de TX-olefinas lineales y debido a que el proceso es complejo (y no se entiende completamente) el producto no es homogéneo sino que consta de dos tipos principales, además de cantidades variables de otras impurezas. La porción principal (cerca de 60 a 65%) consiste de alquil sulfonatos, seguidos por los hidroxí-alquil sulfonatos (35



a 40%), junto con los componentes de menor importancia tales como 1, 2-, 1, 3-y 1, 4-sultones así como disulfonatos y ácido sulfónico. (Schick Martin., 2012, p. 336)

- Usos y aplicaciones

Los sulfonatos  $\alpha$ -olefinas han tenido éxito en los detergentes de uso ligero, lavado de manos, champús, baños de burbujas y jabones sintéticos. También se utilizan para la limpieza de tapicerías y alfombras, y en la industria textil, cuero y cosmética. (Schick Martin., 2012, p. 314)

- Sulfonatos  $\alpha$ -Olefinas en el ambiente

Los AOS son rápidamente biodegradados y mineralizados a tasas ligeramente inferiores a las generada por los alquil sulfatos y ligeramente más rápidas que alquil aril sulfonados. (Schwuger M., 1997, p. 27) (Schick Martin., 2012, p. 378)

#### *1.1.2.2 Tensoactivos no iónicos*

Los agentes activos superficiales que tienen las características moleculares de regiones hidrofílicas e hidrofóbicas distintas y no tienen ninguna carga electrónica se definen como tensoactivos no iónicos. Los surfactantes no iónicos son usados como alternativa a los tensoactivos aniónicos en la limpieza del hogar y las aplicaciones industriales debido a su tolerancia al agua dura, características de espumado menor y eficiencia en la limpieza de compuestos grasos y aceitosos. (Schwuger M., 1997, p. 23)

Además, los tensoactivos no iónicos pueden actuar sinérgicamente con surfactantes aniónicos y mejorar su presentación en micelas mixtas, equilibrando la separación de la carga y mitigando los efectos de la repulsión entre los grupos principales de surfactantes aniónicos, así como de mantener la estabilidad en presencia de cationes polivalentes encontrados en el agua dura. Tales moléculas encuentran el uso dentro de una gama de productos químicos, con un uso importante en detergentes. (Schwuger M., 1997, p. 23)

- Tensoactivos no iónicos en el ambiente

Las rutas hacia el ambiente están dadas en gran medida por su frecuencia de uso. Generalmente, se utilizan en detergentes domésticos, limpiadores del hogar, productos del cuidado personal tales como champús y productos de limpieza comerciales. Las principales rutas para su eliminación son los sistemas de alcantarillados públicos. (Hudzinger M., 2008, p. 323)

Para aquellos lugares con poco o ningún tratamiento biológico, la descarga será directa a las aguas superficiales. Sin embargo, los componentes presentes en los detergentes domésticos modernos se diseñan para ser fácilmente biodegradables con un sistema de tratamiento de aguas residuales usando tratamientos biológicos tales como plantas de lodos activados o filtros que gotean. Su biodegradabilidad también significará que aquellos materiales liberados directamente al ambiente serán degradados por la población natural de microorganismos de las aguas superficiales y del suelo, a los productos finales inorgánicos. (Hudzinger M., 2008, p. 323)

#### *1.1.2.3 Tensoactivos catiónicos*

Los tensoactivos catiónicos representan el tercer grupo más grande de tensoactivos en relación al volumen y están compuestos por una cabeza cargada positivamente conectada a una cola hidrofóbica. El grupo hidrofílico se basa generalmente en un derivado del nitrógeno. (Hayes Douglas, et al, 2009, p. 44)

Los tensoactivos catiónicos son producidos por tres rutas de proceso generales que unen un átomo de nitrógeno o un fragmento que contiene nitrógeno a un grupo hidrofóbico. Las tres rutas incluyen (1) la conversión de un grupo que contiene ácido carboxílico en un intermediario de nitrilo, seguido por la hidrogenación a la amina; (2) productos de condensación a base de ácidos grasos y sus derivados, pero sin intermediarios de nitrilo; y (3) de  $\alpha$ -Olefi NS o alcoholes grasos. Estas rutas pueden producir una gama de tipos de productos, y algunos productos individuales pueden ser derivados a través de varias rutas. (Hayes Douglas, et al, 2005, p. 45)

### **1.2 Interacción de los contaminantes y surfactantes en el agua**

La solubilidad en agua de compuestos hidrofóbicos puede ser modificada por varios factores, tales como la presencia de solventes orgánicos, macro-moléculas, y los tensoactivos, así como también por la presencia de solventes como alcoholes que aumentan la solubilidad hidrofóbica en soluciones acuosas. Los estudios recientes con algunos solutos orgánicos extremadamente insolubles en agua han demostrado que su solubilidad aparente puede ser significativamente mejorada por las bajas concentraciones de algunos ácidos húmicos. Los tensoactivos pueden producir el realce significativo de la solubilidad incluso en concentraciones por debajo del límite, que se atribuye a una partición como la interacción de los compuestos orgánicos insolubles de otra manera extremadamente del agua con el contenido no polar del tensoactivo. (Ochick M., 2012, p. 67)

### **1.2.1 Eutrofización**

La eutrofización es el enriquecimiento excesivo de las aguas con fuentes antropogénicas de nutrientes especialmente nitrógeno (N) y fósforo (P) lo que conduce a la transformación de cuerpos de agua oligotróficos a mesotróficos, luego a eutrofización y finalmente a hipertrófica. La eutrofización restringe el uso del agua para la pesca, la recreación, la industria debido a un aumento en el crecimiento de algas no deseables y malezas acuáticas, así como también la escasez de oxígeno causada por su muerte y descomposición del agua.

El exceso de nutrientes a los cuerpos de agua proviene generalmente de las aguas residuales, descargas industriales, escurrimiento agrícola, obras y zonas urbanas. La eutrofización puede minimizarse regulando las fuentes de nutrientes, reduciendo el uso de fertilizantes, prácticas apropiadas de manejo del suelo, fitorremediación etc. (Ansari Abid & Sing Sarvajeet, 2014, p. 22)

### **1.2.2 Medidas de control**

Las actividades antropogénicas, son consideradas como la principal causa de enriquecimiento de nutrientes y de eutrofización de cuerpos de agua. Mediante la aplicación de una serie de medidas tecnológicas, legislativas y biológicas se puede solucionar la eutrofización: (Ansari Abid & Sing Sarvajeet, 2014, p. 37)

### **1.2.3 Control biológico**

La eutrofización inducida por fósforo afecta a la calidad del agua en los sistemas acuáticos, particularmente en agua dulce, en todo el mundo. El procesamiento de nutrientes en hábitats poco profundos elimina el fósforo del agua naturalmente. Los Periphytons (mezcla compleja de algas, cianobacterias, microbios heterotróficos y detritus que se une a superficies sumergidas en la mayoría de los ecosistemas acuáticos) son considerados como una de las herramientas para la extracción de fósforo en aguas lólicas y humedales. (Ansari Abid & Sing Sarvajeet, 2014, p. 39) (Allan R., et al, 2005, p. 45)

Los Periphytons juegan varios roles en la eliminación de fósforo, incluyendo la toma, la deposición y filtrado de partículas de fósforo presente en el agua. La fotosíntesis de Periphytons localmente aumenta pH hasta 1, que puede llevar a la precipitación creciente del fosfato de calcio, la deposición concurrente de los complejos del carbonato-fosfato y la eliminación de largo plazo de fósforo. (Ansari Abid & Sing Sarvajeet, 2005, p. 47)

### 1.2.3.1 Fitorremediación

La fitorremediación es un método que utilizan varias plantas para extraer, contener, inmovilizar o degradar los contaminantes del suelo y del agua. Algunas plantas pueden eliminar los contaminantes de la tierra por la toma directa, seguido de la transformación, transporte y acumulación. En los cuerpos de agua dulce, la fitorremediación es eficaz en la reducción de la toxicidad de las aguas causadas por microorganismos que liberan amoníaco y sulfuro durante la degradación de la proteína procedente de las industrias alimenticias. (Sing A., 2013, p. 117)

Se han realizado estudios que identifican a varias especies de plantas capaces de reducir el exceso de nitrógeno y fósforo del sistema acuático. Por ejemplo, los macrófitos acuáticos como *Eichhornia crassipes* y *Salvinia auriculata* causan una reducción significativa de los compuestos de nitrógeno y fósforo en el agua. (Sing A., 2013, p. 117)

La fitorremediación incluye procesos como: la fitodegradación, fitoextracción, fitoestabilización, fitovolatilización y rizofiltración.

## 1.3 Legislación ambiental

La Norma Técnica Ecuatoriana 849 Agentes tensoactivos, detergente en polvo para uso doméstico. Tiene como objetivo establecer los requisitos que debe cumplir el detergente en polvo sintético para uso doméstico, así como también establecer el límite de biodegradabilidad que deben contener dichos detergentes. (NTE INEN 849, 2015, p. 4.)

**Tabla 1-2.** Requisitos físicos-químicos del detergente en polvo para uso doméstico.

Requisitos	Mínimo	Máximo	Método de ensayo
Materia grasa total, % <sup>a</sup>	-	5	NTE INEN 823
Materia activa valorable, % <sup>a</sup>	10	-	NTE INEN 833
Alcalinidad libre como NaOH, % <sup>a</sup>	-	0.5	NTE INEN 821
Materia insoluble en agua <sup>b</sup> , % <sup>a</sup>	-	2.5	NTE INEN 816
Humedad y materia volátil, % <sup>a</sup>	-	15	NTE INEN 818
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , % <sup>a</sup>	-	10	NTE INEN 830
pH <sup>c</sup>	-	11	NTE INEN-ISO 4316
Biodegradabilidad del tensoactivo, % <sup>a</sup>	90	-	ASTM D2667
<sup>a</sup> % corresponde a fracción de masa expresada en porcentaje <sup>b</sup> Este valor puede ser mayor que el indicado siempre y cuando el componente que lo origine tenga un propósito determinado y sea seguro para la piel <sup>c</sup> Solución al 1 %			

Fuente: NTE INEN 849, 2015, p. 4.

## 1.4 Normas ASTM

La Asociación Americana de Ensayo de Materiales (ASTM) es una organización de normas internacionales que desarrolla y publica acuerdos voluntarios de normas técnicas para una amplia gama de materiales, productos, sistemas y servicios.

### ***1.4.1 Norma ASTM D2667 Método de Prueba Estándar para Biodegradabilidad de Alquil Benceno Sulfonato Lineal.***

Describe el método de ensayo para determinación del grado de biodegradabilidad de los alquilbencenosulfonatos. (ASTM D2667, 2008, p. 3.)

Este método ASTM D2667 cubre la determinación del grado de biodegradabilidad de los alquilbencenosulfonatos. Sirve como índice de la idoneidad del sulfonato para uso general como tensoactivo.

En general, este método de ensayo distingue entre sulfonatos en los que las cadenas laterales de alquilo son lineales y aquellas en las que son ramificadas, ya que las primeras son más fácilmente biodegradables. Si se ha de examinar el sulfonato de alquilbenceno en los productos totalmente formulados. (ASTM D2667, 2008, p. 4.)

#### ***1.4.1.1 Importancia y Uso***

Este método de ensayo está diseñado para determinar si el sulfonato ensayado será eliminado por los métodos usuales de tratamiento de aguas residuales para que pueda ser descargado al ambiente de forma segura sin tratamiento adicional. Si la reducción del surfactante en la prueba presuntiva es igual o superior al 90%, se considera que el material es biodegradable adecuadamente sin más pruebas.

Si la reducción del surfactante en el ensayo presuntivo está entre 80 y 90%, el material debe someterse a la prueba de confirmación. (ASTM D2667, 2008, p. 6.)

#### ***1.4.2 Norma ASTM D2330 Método de Prueba Estándar para Sustancias Activas al Azul de Metileno.***

Este método de ensayo es un procedimiento de control simple, rápido, adecuado para controlar la eficacia de un proceso de eliminación de alquilbenceno sulfonato (LAS) lineal o de biodegradación.

Es aplicable para la determinación de compuestos que reaccionan con azul de metileno en las condiciones especificadas en el procedimiento de ensayo. Se denominan sustancias activas de azul de metileno (MBAS), y se calculan e informan en términos del material de referencia, alquil bencenosulfonato lineal, LAS.

Para una mayor especificidad y eliminación de la interferencia, se debe utilizar el procedimiento de pretratamiento del Anexo A1. Los datos obtenidos sin el tratamiento previo deben ser interpretados con cuidado. Este método de ensayo es aplicable en el intervalo de 0,03 a 1,5 mg / l para una muestra de 100 ml. (ASTM D2330, 2002, p. 5.)

##### ***1.4.2.1 Significado y uso***

El uso generalizado y la descarga de detergentes en las aguas superficiales pueden provocar la reducción de su calidad estética debido a la formación de espuma y a la toxicidad para la fauna acuática.

Este método de ensayo es capaz de detectar pequeñas concentraciones de detergentes como MBAS para que puedan ser controlados.

Los alquilbencenosulfonatos lineales (LAS) biodegradables han sustituido a los alquilbencenosulfonatos (ABS) de cadena ramificada en formulaciones de detergentes, los cuales eran más resistentes a la biodegradación. La diferenciación entre los alquilbencenosulfonatos de cadena lineal y ramificada, así como la diferenciación de los diversos isómeros de posición de cualquier tipo, no es posible mediante la ASTM D2330.

##### ***1.4.2.2 Interferencias***

Cualquier compuesto orgánico o inorgánico que produzca un par de iones extraíbles con cloroformo interferirá produciendo resultados altos. Estas interferencias positivas incluyen

sulfonales orgánicos, carboxilatos, fosfatos y fenoles, así como cianatos inorgánicos, cloruros, nitratos y tiocianatos.

Cualquier compuesto que compita efectivamente con el azul de metileno para formar un par de iones LAS dará resultados negativos. Esta interferencia negativa está demostrada por aminas y tiene significación analítica en el caso de compuestos de amonio cuaternario. (ASTM D2330, 2002, p. 6.)

## CAPÍTULO II

### 2 METODOLOGÍA

#### 2.1 Marco metodológico

##### 2.1.1 *Tipo y diseño de la investigación*

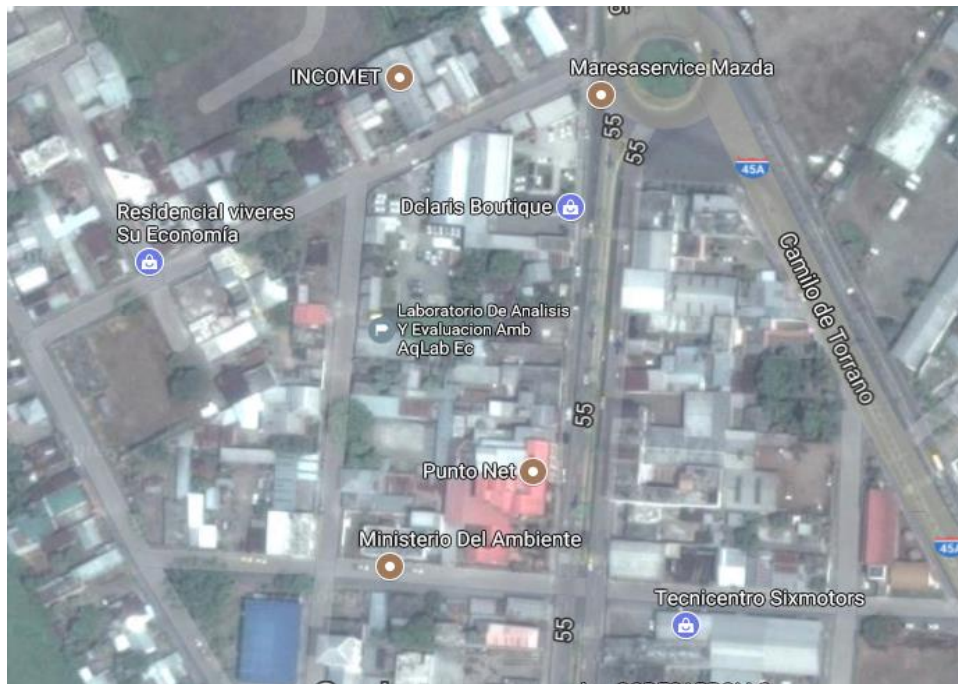
Esta investigación está enfocada a la evaluación y aplicación de los métodos estandarizados, considerando la parte teórica y experimental fundamentales en el desarrollo de la misma. Ambas partes desarrolladas y ejecutadas a la par, ya que con la ayuda de las normas ASTM e INEN, se logró conocer los procedimientos establecidos para la biodegradabilidad de los detergentes comerciales específicos, para la puesta a punto del método y la parte experimental de la investigación. Se utilizó las instalaciones del Laboratorio AQLAB, y todo su equipamiento, reactivos y demás materiales auxiliares para el cumplimiento de la presente investigación.

Se hicieron los ajustes y correcciones necesarias a cada uno de los procedimientos, acorde a las necesidades del laboratorio y de la investigación, enfocándose en tres tipos de detergentes comerciales y en la evaluación de la eficiencia para la biodegradación aplicando la cepa ATCC25922 (*Escherichia coli*), lodos activos y agua de río.

##### 2.1.2 *Localización geográfica de la investigación.*

El desarrollo experimental de la investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Análisis y Evaluación Ambiental AqLab, cuyas instalaciones se encuentran en la Ciudad de Puerto Francisco de Orellana (Coca), en las calles Fray Gregorio de Alúmina y Juan Huncite, Barrio Con Hogar, en la Provincia de Orellana. Georreferenciado en las Coordenadas: UTM 18M X: 0279263; Y: 9948509.





**Figura 1-2. Mapa de ubicación de AqLab Laboratorio.**

Fuente: Google Maps, 2017.

### **2.1.3 Unidad de análisis**

Biodegradabilidad de tensoactivos: Determinado en porcentaje de peso de Alquil Sulfonatos (LAS)

### **2.1.4 Técnicas de recolección de datos.**

Análisis de laboratorio.

### **2.1.5 Técnicas e instrumentos analíticos**

#### **2.1.5.1. Métodos**

Se usó la Norma Nacional NTE INEN 849, la cual establece los requisitos que deben cumplir los detergentes de uso doméstico, esta norma hace referencia al método de norma ASTM D2667, para la fase de incubación, evaluación de eficiencia de la cepa ATCC25922 (*Escherichia coli*), todos activos y descarga de río, así como el porcentaje de biodegradabilidad del tensoactivo, y ésta a la vez hace referencia a la norma ASTM D2330 para el análisis de la concentración del tensoactivo contenido en las muestras (LAS) en mg/L.

También se utilizó los instructivos internos del Laboratorio AqLab, ITO-AQLAB-08, ITU-AQLAB-01, ITE-AQLAB-35, los cuales describen los procedimientos para: manejo de cepas, manejo de equipo UV-VIS y la determinación de biodegradabilidad de tensoactivos.

#### *2.1.5.2. Equipos, materiales y reactivos*

Para el desarrollo y culminación satisfactoria de la investigación fueron necesarios los siguientes materiales.

##### a) Equipos

- Balanza Analítica, Resolución 0,0001
- Incubadoras, 35 °C.
- Plancha de agitación Magnética (Oxitorp)
- Espectrofotómetro UV-VIS. a 652 nm
- pHmetro
- Sorbona.

##### b) Reactivos

- Cepa ATCC 25922 (*Escherichia coli*).
- Sulfato Ferroso,
- Cloruro de Amonio,
- Cloruro de Potasio,
- Extracto de Levadura,
- Ácido Sulfúrico,
- Hidróxido de Sodio.
- Azul de Metileno.
- Indicador de fenolftaleína.
- Cloroformo,
- Solución de Lavado.
- Agua destilada, tipo I.
- Estándar de LAS.
- Detergente A
- Detergente B
- Detergente C
- Agua natural de río.
- Lodos activos.

##### c) Materiales

- Balones de aforo 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml.

- Probetas 500 ml, 1000 ml.
- Botellas para incubación 500ml.
- Pipetas Automáticas, 1ml, 5 ml, 10 ml.
- Pissetas 500 ml.
- Vasos de precipitación 50 ml.
- Embudos de separación 500 ml, gradilla.
- Embudos vástago de vidrio.
- Papel Filtro Wathman 40
- Pipetas Pasteur 2,5 ml
- Asa de platino.

### ***2.1.6 Condiciones ambientales y conservación de las muestras***

El procedimiento ordinario para el control de las condiciones ambientales a nivel general del laboratorio especifica que la temperatura debe ser  $< 35^{\circ}\text{C}$ , y la humedad relativa  $< 80\%$ , y al tratarse de condiciones de la investigación para el almacenamiento e incubación de las muestras durante la etapa de biodegradación de 0 a 8 días, se controla una temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 3$ . Los reactivos, que son conservados a  $4^{\circ}\text{C}$ , como el caso del estándar LAS, deben acondicionarse a temperatura ambiente para poder ser usado.

Los datos fueron obtenidos mediante un DATALOGER, el cual registra y guarda las temperaturas del área de incubación durante los 8 días de incubación, cuyo fin es asegurar que la temperatura se mantenga dentro del rango de trabajo, así mismo con la ayuda de este equipo y el software descargamos los datos en un resumen de tablas y un diagrama de # Datos vs la Temperatura. Ver Anexos C – D.

## **2.2 Diseño experimental**

### ***2.2.1 Selección de detergentes comerciales.***

El laboratorio cuenta con detergentes comerciales de diferente tipo los mismos que son proporcionados por clientes, de los cuales se tomaron tres muestras al azar dependiendo de su estado (sólido y líquidos) siendo estos: polvo, líquido y crema. (Anexo A- Figura 16)

### ***2.2.2 Curva de calibración***

Dentro de los criterios de ensayo y control de calidad del laboratorio, antes de implementar un

método de análisis, es necesario elaborar una curva de calibración para los métodos que así lo indican, este se realizó según las referencias de normas SM5540C, al igual que la ASTM D2330, detallando una gráfica de concentración vs. absorbancias.

Para verificar que las curvas de calibración cumplan con requisitos mínimos y que éstas sean consideradas válidas, se realizaron cuatro curvas, a lo cual se dió un tratamiento estadístico básico, para finalmente determinar los criterios de aceptación y rechazo de pendiente e intercepto en futuras calibraciones.

La curva de calibración se realizó usando un estándar de trabajo de LAS puro, a diferentes concentraciones (mg/l) en orden ascendente, con los cuales se procedió a la extracción con cloroformo, para luego medir las absorbancias en el equipo de UV-VIS.

### 2.2.3 Muestra de agua de río.

La muestra de agua de río, se tomó en un punto de descarga de aguas residuales de ciudad Francisco de Orellana en el río Napo, en la cual se determinó la concentración de *Escherichia coli*. Además, esta muestra se usó como inóculo en la investigación y con ésta se evaluó la eficiencia de biodegradación de los tensoactivos durante el periodo de prueba. (Anexo A – Figura 17).

**Tabla 1-2:** Determinación de *E. coli* en el agua de río.

Parámetro	Método	Referencia	Unidades	Resultados
<i>Escherichia coli</i>	ITE-AQLAB-29	SM999	Colonias / 100ml	4,2x10 <sup>4</sup>

**Realizado por:** Jessica Chinkim, 2017.

**Fuente:** Datos de análisis de recuento *E. coli*.

### 2.2.4 Muestra de lodos activos

Las muestras de lodos activos, fue proporcionada por una empresa que realiza tratamiento de aguas negras y grises, de la misma forma se realizó la determinación de la concentración de *E. coli* en la muestra, y la misma se usó como inóculo para la fase de incubación de tensoactivos y determinación del porcentaje de biodegradabilidad. (Anexo A – Figura 18).

**Tabla 2-2:** Determinación de *E. coli* en Lodo Activo

Parámetro	Método	Referencia	Unidades	Resultados
<i>Escherichia coli</i>	ITE-AQLAB-29	SM999	Colonias / 100ml	1,1X10 <sup>5</sup>

**Realizado por:** Jessica Chinkim, 2017.

**Fuente:** Datos de análisis de recuento *E. coli*.

### ***2.2.5 Material de Referencia Certificado ATCC 25922 Escherichia coli***

La activación de la cepa de *E. coli* se realizó bajo el procedimiento interno del Laboratorio ITO-AQLAB-08, el cual describe como activar y cuantificar el material de referencia certificado, para posteriormente servir como inóculo en la determinación del porcentaje de biodegradabilidad.

Se realiza el siguiente procedimiento para la activación y determinación de *E. coli*.

#### ***2.2.5.1 Preparación de reactivos***

- Agar BHI (Brain Heart Infusión)

Se suspende 37 g del polvo en 1 litro de agua destilada. Se mezcla bien. Se calienta agitando. Se hierve durante un minuto para disolver completamente el polvo. Se autoclava 121°C durante 15 minutos.

- Agar PCA (Plate Count Agar)

Se suspende 23,5 g del polvo en 1 litro de agua destilada. Se mezcla bien. Se calienta agitando. Se hierve durante 1 minuto para disolver completamente el polvo. Se autoclava a una temperatura de 121°C por 15 min.

- Ácido Sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) al 1% (vol/vol)

Se añade 1 ml de ácido sulfúrico concentrado y se afora a 100 ml con agua destilada.

- Cloruro de Bario di-hidratado ( $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) al 1,175% (p/vol)

Se pesa 1.1797 g y se afora a 100 ml con agua destilada (concentración del  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  al 99.6%)

#### ***2.2.5.2 Aislamiento de colonias***

Una vez determinada la concentración de *E. coli* en las muestras: agua de río, lodos activados; se procede al aislamiento de las bacterias nativas de cada muestra.

Con la ayuda de un asa estéril, se toma las bacterias *E.coli* de las placas petrifilm, y se colocan en tubos que contienen 25 ml de BHI, se incuba a 35<sup>0</sup> C por 24 horas.

Se realiza el mismo procedimiento del apartado (3.2.5.7.) para llegar a concentración 1x10<sup>8</sup> col/ml, y que este sea el inóculo en la determinación de biodegradabilidad de detergentes.

#### 2.2.5.3 Preparación del estándar de McFarland

La **turbidez estándar de 0,5 de McFarland** es la más utilizada y ésta, se prepara añadiendo 0,5 ml de una solución de cloruro de bario di-hidratado más 99,5 ml de ácido sulfúrico.

La comprobación de la exactitud de la densidad de la turbidez estándar McFarland 0.5; se realiza, mediante un espectrofotómetro con un paso de luz de 1 cm; para la turbidez estándar de 0,5 de McFarland, la absorbancia de una longitud de onda de 625 nm debe ser de 0,08–0,1.

Se sella el tubo tapa rosca de turbidez estándar de McFarland con parafilm para prevenir la evaporación, este se puede guardar hasta 6 meses en la oscuridad a temperatura ambiente (22°C–25°C); se descarta después de 6 meses o antes si pierde algún volumen. (Se marca el tubo para indicar el nivel del líquido y se verifica antes de utilizarlo para estar seguro que no ha ocurrido evaporación, si esto ocurre, se debe preparar nuevamente).

Antes de utilizar el tubo, se agita bien en el vórtex de manera que el precipitado blanco fino de sulfato de bario se mezcle en el tubo.

#### 2.2.5.4 Proceso de activación de la cepa de referencia ATCC 25922.

- a) Se deja la bolsa KWIK-STIK sin abrir a temperatura ambiente para equilibrar su temperatura de congelación a la de trabajo. Se rompe la bolsa por la parte marcada y se retira la unidad KWIK STIK.
- b) Se arranca parte *Pull-Tab* en la etiqueta y se adjunta a la placa de cultivo primario (5 placas con agar PCA) o se registra en el control de calidad. No quite la etiqueta durante la hidratación.
- c) Se presiona una sola vez la ampolla en la parte superior del KWIK-STIK (justo debajo de la marca de aforo del fluido de la ampolla) que se encuentra en la tapa para liberar el fluido

hidratante.

- d) Se sostiene verticalmente y se pulsa sobre una superficie dura para facilitar el flujo de fluido a través del eje en la parte inferior de la unidad que contiene pellets. Se permite que el fluido hidratante fluya a través del mango del hisopo y en la parte inferior de la unidad que contiene el pellet.
- e) Se aplasta con los dedos la parte inferior de la unidad, se aplasta el precipitado en el líquido hasta que la suspensión de pellets sea homogénea.
- f) Inmediatamente en gran medida se satura el hisopo con el material hidratado y se traslada a la placa con agar nutritivo PCA. Se inocula en la placa que contiene agar PCA, rodando suavemente el hisopo sobre tercio de la placa.
- g) Se utiliza un asa estéril, se distribuye para facilitar el aislamiento de colonias.
- h) Se descarta el KWIK-STIK siguiendo el procedimiento adecuado del laboratorio.
- i) Inmediatamente, se incuba las placas con el material de referencia a 35°C en atmósfera aerobia de 24 a 48 horas.

#### *2.2.5.5 Conservación de la cepa de referencia ATCC 25922*

- a) Después de 24 horas de incubación (apartado 3.2.5.3.), se toma 12 tubos tapa rosca capaces de contener 10 ml, se añade 3 ml de agua desmineralizada y 3 ml de leche descremada UHT, y se autoclava a 121°C por 15 minutos.
- b) Se deja enfriar hasta una temperatura promedio de 35 °C.
- c) Con un asa de platino se pasa las bacterias de las placas activadas y se transfiere al tubo estéril que contiene la mezcla agua-leche.
- d) Se agita, se etiqueta y se guarda en el congelador a una temperatura  $\leq -10^{\circ}\text{C}$ .

#### *2.2.5.6 Preparación del cultivo primario*

La preparación de este cultivo se realiza a partir de la cepa activada o de la cepa conservada:

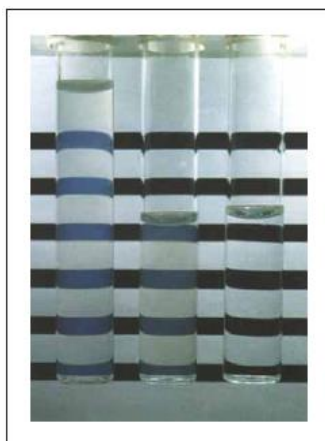
- a) Se coloca en un tubo tapa rosca 25 ml de medio de cultivo BHI y se autoclava a 121°C por 15 minutos.
- b) Una vez que este se enfríe y alcance una temperatura promedio de 35 °C, con la ayuda de un asa de transferencia, se pasa los microorganismos de la cepa activada (literal i, apartado 3.2.5.3.), o a su vez la cepa conservada (apartado 3.2.5.4) hacia el tubo que contiene BHI estéril preparado anteriormente y se deja incubar por 24 horas a 35°C.
- c) Al siguiente día se puede observar que hubo el crecimiento de microorganismos, ya que la solución presenta una apariencia turbia.

#### 2.2.5.7 Preparación de la suspensión bacteriana $1 \times 10^8$ ufc/ml.

Para preparar la suspensión bacteriana que contenga  $1 \times 10^8$  ufc/ml, es decir una suspensión equivalente a la turbidez estándar de 0,5 de McFarland, se realizó lo siguiente:

- En un tubo vacío estéril se coloca 1 ml del cultivo primario (apartado 3.2.5.5.) y 5 ml de agua de peptona.
- Se compara la turbidez de la suspensión, con la turbidez estándar 0,5 en la escala de McFarland, esto se realizó sosteniendo los dos tubos frente a una luz contra un fondo blanco con líneas negras de contraste.
- Si la densidad es muy pesada, se debe diluir la suspensión añadiendo agua de peptona. Si la densidad es muy ligera, añadir más bacterias a la suspensión.

Nota: cada que se añada suspensión bacteriana y agua de peptona se debe agitar en el vortex antes de realizar una comparación visual.

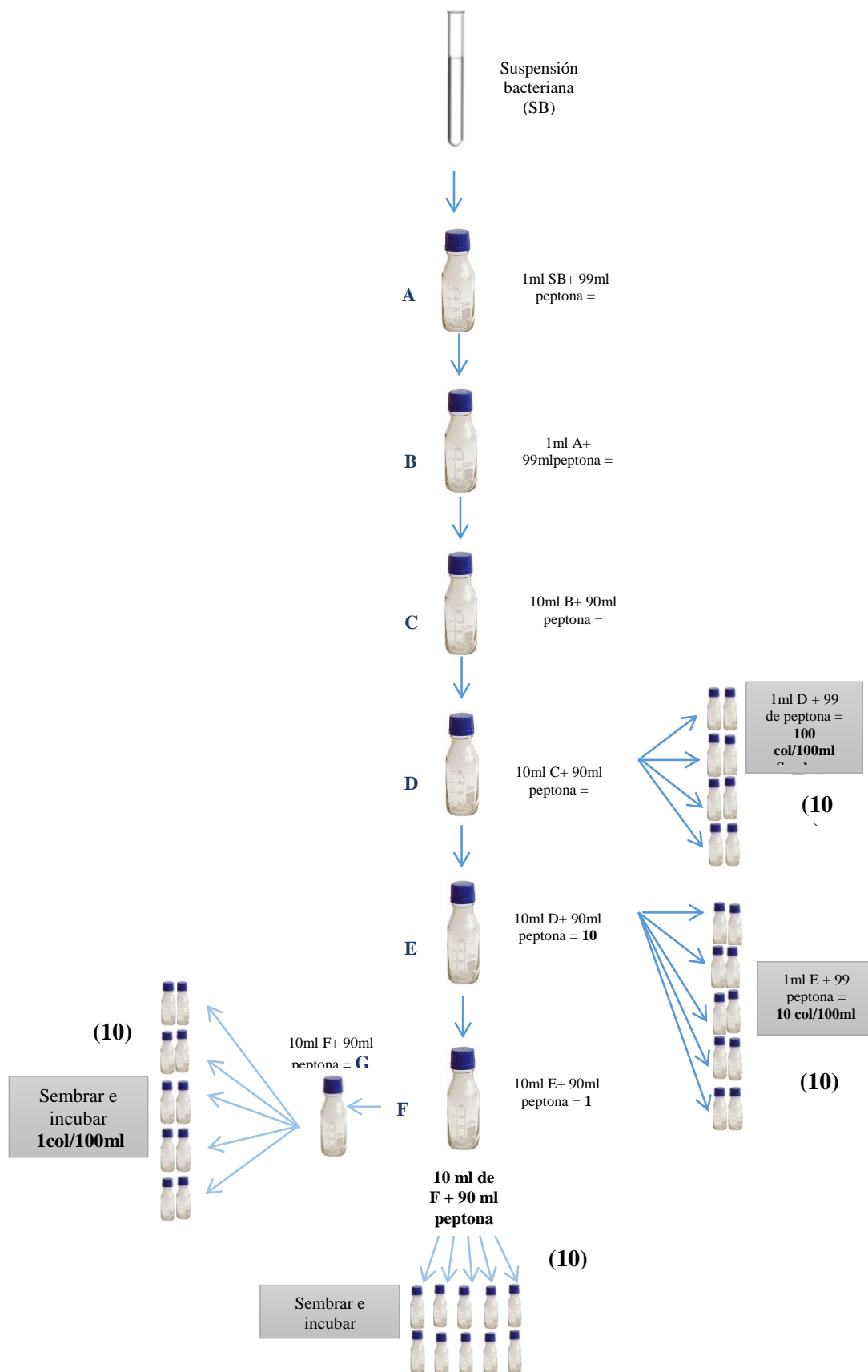


**Figura 2-2:** Comparación visual de la escala McFarland

Realizado por. Jessica Chinkim.

- Cuando ya se obtiene la turbidez de la suspensión bacteriana  $1 \times 10^8$  ufc/ml, se agita vigorosamente el tubo preparado de la suspensión bacteriana en el vórtex y se realiza diluciones sucesivas siguiendo el siguiente esquema:





**Figura 3-2:** Diluciones sucesivas para la determinación de la cepa de referencia ATCC 25922.

**Realizado por:** Jessica Chinkim.

- e) Finalmente, con diluciones sucesivas se llega hasta el nivel D para realizar el control de calidad de la concentración Mc Farland 0,5 ( $1 \times 10^8$  ufc/ml). Se siembra por duplicado y se incuba en placas de petrifilm *E.coli* 35°C por 24 horas. Se obtiene los recuentos descritos en la tabla 3-3.

**Tabla 3-2:** Control de calidad de *E.coli* en los inóculos para la biodegradabilidad.

Parámetro	Método	Referencia	Unidades	Resultados
<i>Cepa E. coli</i>	ITE-AQLAB-29	SM 999	Colonias / 100ml	82
				110
<i>Agua de río</i>				96
				115
<i>Lodos activos</i>				85
				98

**Realizado por:** Jessica Chinkim, 2017.

**Fuente:** Datos de Análisis de Recuento *E. coli*.

### 2.2.6 Preparación de las soluciones de detergentes.

Tal como se indica en la Norma NTE INEN 849, el porcentaje de biodegradabilidad del tensoactivo debe estar expresada en relación al peso, se concluye que: para cada tipo, presentación, estado del producto tensoactivo se pesará  $1,0000 \pm 0,0100$  gramos del producto, con la finalidad de relacionar directamente los cálculos de expresión final en porcentaje.

#### 2.2.6.1 Determinación del peso/volumen para el ensayo.

Para determinar la cantidad en peso del detergente o producto a ser analizado, se estima en muchos de los casos las indicaciones de uso, para luego ser diluido a un volumen manejable durante el ensayo de biodegradabilidad.

**Tabla 4-2:** Peso y volumen de aforo empleado para el ensayo de tensoactivos.

Detergente	Peso/Volumen	Volumen de aforo con agua destilada
A. Líquido	1 ml aprox	1000 ml
B. Polvo	1 gramo aprox.	1000 ml
C. Crema	1 gramo aprox	1000 ml

**Realizado por:** Jessica Chinkim, 2017.

## 2.2.7 Método de Prueba Estándar para Biodegradabilidad de Alquil Benceno Sulfonato, ASTM D2667

### 2.2.7.1 Reactivos y materiales

- Agua destilada tipo I (libre de interferentes).
- Medio Basal: La composición del medio basal fue la siguiente:

**Tabla 5-2:** Composición del medio de cultivo o medio basal.

Reactivo/Solución	Cantidad/ Concentración
NH <sub>4</sub> Cl Cloruro de amonio	3.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (Sulfato de Magnesio heptahidratado)	0.25g
KCl Cloruro de potasio	0.25 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (Sulfato de Hierro heptahidratado)	0.002 g
Extracto de levadura	0.30g
Agua Destilada	1000 ml

**Fuente:** ASTM D2667. 1991. Composición del medio basal

**Realizado por:** Jessica Chinkim, 2017.

El medio basal se preparó disolviendo secuencialmente NH<sub>4</sub>Cl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KCl y FeSO<sub>4</sub> ·7H<sub>2</sub>O en aproximadamente 800 ml de agua y ajustando a un pH a  $7,2 \pm 0,2$  con una solución diluida de HCl (Ácido clorhídrico) o NaOH (Hidróxido de Sodio). El extracto de levadura y MgSO<sub>4</sub> ·7H<sub>2</sub>O disolver en 200 ml de agua destilada, esta solución se añade con agitación a la primera solución. Alternativamente, el medio puede prepararse usando soluciones madre adecuadas de las sales, pero el pH debe ajustarse antes de añadir el MgSO<sub>4</sub> ·7H<sub>2</sub>O.

El extracto de levadura se debe añadir en forma seca inmediatamente. Es importante utilizar el medio basal inmediatamente después de la preparación para evitar el crecimiento bacteriano.

Se verifica el pH del medio antes de su uso y ajustar a un pH 6,8 -7,2 si es necesario. Se tapan los frascos con tapones de algodón para reducir la contaminación y la evaporación.

- Cultivo microbiano o inóculo

Se seleccionó tres inóculos microbianos: agua de río, lodos activos y el material de referencia *E. coli* ATCC 25922.

#### 2.2.7.2 Normalización o control de referencia

Como control sobre el cultivo y las condiciones de ensayo utilizadas, el ensayo final es inválido si el resultado con una referencia adecuada de alquil sulfonato lineal es menor que el 90% de eliminación del tensoactivo, esto determinado por la pérdida de concentración del tensoactivo.

#### 2.2.7.3 Procedimiento

##### 2.2.7.3.1 Adición del tensoactivo al medio basal

En matraces capaces de contener 250 ml se añade 80 ml de medio basal, más 20 ml de solución de tensoactivo (A,B,C), a parte se coloca un matraz para el estándar de control (concentración 1,2 mg/l) y finalmente un matraz para un blanco (contiene todos los componente pero sin tensoactivo) que se utiliza para corregir los resultados de los otros frascos.

El laboratorio Aqlab dispone de un estándar de LAS cuya concentración es de 60 mg/l, a partir del cual se preparó una solución estándar control de 1,2 mg/l. Este estándar cumple los estándares de biodegradabilidad de las pruebas presuntivas y de confirmación a través de la Agencia de Protección Ambiental (EPA). La pureza y composición de este estándar de LAS se detallan en el anexo E.

##### 2.2.7.3.2 Inoculación

Se añade el mismo inóculo para todos los frascos del lote, es decir, que cada uno de los frascos contienen 20 ml de muestra (Detergente A, B y C), 80 ml de medio basal y 1 ml del inóculo, incluyendo el frasco del control y el blanco.

##### 2.2.7.3.3 Incubación

Se ajusta el pH de 6 a 8 al comienzo de cada período de incubación. Se coloca los frascos en una plancha de agitación magnética que produzca aireación y una mezcla aceptable para la biodegradación. Se mantiene la temperatura del contenido del matraz a  $25 \pm 3$  ° C.

#### 2.2.7.3.4 *Análisis del porcentaje de biodegradación del tensoactivo.*

El método de prueba ASTM D2330 se debe seguir exactamente ya que elimina los efectos de los iones interferentes que podrían estar presentes en las muestras.

La determinación de detergentes en las muestras se realiza a los cero días (antes de incubar) y a los 8 días una vez terminada la incubación.

Nota: De ser el caso y que los análisis no se realicen de inmediato, se debe utilizar 1 ml de formaldehído/100 ml de muestra para la conservación de cualquier muestra (0 días y 8 días). Cuando se utilice un conservante, agregue a todas las muestras incluyendo en blanco y almacene las muestras a 4°C.

#### 2.2.7.4 *Cálculo*

Para determinar el porcentaje de biodegradabilidad del detergente, se consideró el valor analizado del blanco y el estándar control, a los 0 días y a los 8 días, con la finalidad de realizar una corrección a los demás valores analizados para los frascos que contengan las muestras. Estos valores fueron expresados en mg/l, para luego mediante la siguiente fórmula, sea determinada en porcentaje.

Se calculó el porcentaje de eliminación de la reducción en la concentración de tensoactivo con la siguiente formula:

$$\% \text{ Eliminación Día } x = \frac{(S_0 - B_0) - (S_x - B_x)}{S_0 - B_0} \times 100$$

Dónde:

$S_0$  = Análisis de cultivos tensoactivos de ensayo inicial

$S_x$  = Análisis de cultivos tensoactivos de ensayo a x días,

$B_0$  = Análisis de cultivos en blanco de ensayo inicial,

$B_x$  = Análisis de los cultivos en blanco de ensayo a x días.

Expresada como concentraciones de MBAS, mg / l.

El análisis de la biodegradabilidad en muestras de tensoactivos se determinó con la reducción en la concentración con respecto al día cero y octavo, es decir el valor de la concentración inicial menos el valor de la concentración final.

## **2.2.8 Método de Prueba Estándar para Sustancias Activas de Azul de Metileno, ASTM D2330**

### **2.2.8.1 Acondicionamiento de cristalería**

Todos los objetos de vidrio utilizados para la determinación de LAS deben estar libres de arañazos y marcas de decapado debido a la tendencia de los materiales tensoactivos a adsorberse en este tipo de superficie. Todos los frascos volumétricos (balones de aforo, embudos de separación) y células fotométricas, proyectados para su uso en determinaciones de LAS, deben estar bien lavados, secados y drenados con cloroformo, esto con el fin de evitar contaminación cruzada por mala limpieza de los materiales.

### **2.2.8.2 Curva de calibración con estándar de LAS 60 mg/l**

Se preparó una serie de estándares de concentración conocida añadida a partir del patrón de LAS con ayuda de pipetas automáticas a una serie de balones de aforo a 100 ml de volumen con agua destilada, obteniéndose los siguientes niveles de concentración:

**Tabla 6-2:** Preparación de la curva de calibración

<b>ml de la solución de LAS</b>	<b>A partir de la solución estándar de:</b>	<b>Concentración final de LAS (mg/L)</b>	<b>Balones de aforo final (ml)</b>
0	6 mg/L	0,00	100
1,67	6 mg/L	0,10	100
5	6 mg/L	0,30	100
8,33	6 mg/L	0,50	100
1,67	60 mg/L	1,00	100
3,33	60 mg/L	2,00	100

**Realizado por:** Jessica Chinkim, 2017.

### **2.2.8.2.1 Extracción de LAS para la curva de calibración**

- Luego de preparar las soluciones para la curva de calibración se coloca 100 ml de los estándares y un blanco en los embudos de separación de 500 ml.
- Se añade 3 gotas de solución de fenoltaleína y suficiente solución de hidróxido sódico para producir un color rosa. Se añade solución diluida de ácido sulfúrico (0.7% v/v), en pequeños incrementos hasta que el color rosa desaparezca.
- Se añade 25 ml de solución de azul de metileno en el embudo, tapar el embudo y agitar suavemente.

- d) Se añade 50 ml de cloroformo en el embudo, tapar el embudo y agitar suavemente durante 30 segundos, eliminar la presión del embudo abriendo la llave del mismo con dirección hacia arriba.
- e) Se añade 50 ml de solución de lavado de fosfato a los extractos combinados de cloroformo en el embudo de separación.
- f) Agitar vigorosamente por 30 segundos. Deje sedimentar durante un minuto.
- g) Se filtra la capa de cloroformo a través de un filtro en un balón de 100 ml.
- h) Se repite la extracción. Se añade 50 ml de cloroformo al embudo de separación, agitar y dejar que sedimente.
- i) Se añade cloroformo adicional en el embudo según sea necesario y se repite la extracción para llevar el matraz al balón de 100 ml.
- j) Se utiliza una celda de luz de 10 mm, a una longitud de onda de 652 nm, ajustar el fotómetro a cero de absorbancia con el extracto del blanco de calibración.
- k) Se mide la absorbancia de cada uno de los extractos. Debido a la tendencia a desvanecerse lentamente, la absorbancia del complejo de azul de metileno extraído se debe medir a los 30 minutos después de la formación.

Registrar las Absorbancias y Concentraciones de LAS (mg/L) para obtener la curva de calibración y guardar en el equipo UV-Vis.

#### 2.2.8.3 Procedimiento para extracción de LAS en los detergentes

- a) Se procesa las muestras y un estándar de control comprendido en la escala de los niveles de la curva de calibración, y un duplicado de cualquier muestra, esto con la finalidad de llevar un control de calidad de los resultados.
- b) Seguir los pasos detallados en el ITE-AQLAB-35. (apartado 3.2.8.2.1.)

Si se forma una cantidad excesiva de emulsión con una muestra y es evidente que se producirá una pérdida sustancial de MBAS, se aplica calor por una corriente de agua caliente al exterior del embudo de separación en la zona de la capa de emulsión o a su vez filtrar la emulsión a través de un filtro para eliminar las partículas, materia orgánica, etc.

#### 2.2.8.4 Cálculos de la concentración de detergente

Calcular y expresar como MBAS, la concentración aparente de alquilbencenosulfonato lineal como sigue:

$$MBAS\left(\frac{mg}{L}\right) = Wx \frac{1000}{S}$$

Dónde:

W = LAS en la muestra de la tabla de calibración para la celda de absorción apropiada, miligramos

S = volumen de muestra seleccionado, en mililitros.

Se sigue los procedimientos descritos en los ítems de extracción y lectura: se evalúa la norma de control de calidad, se determina si el método está bajo control y procede a aceptar o rechazar los resultados de ese conjunto de análisis.

La fórmula detallada anteriormente considera la corrección en el caso que se utiliza un volumen de muestra para la extracción, que no sea los 100ml.

El resultado expresado por el equipo (UV-VIS) como concentración mg/l, se emplea directamente para determinar el porcentaje de biodegradabilidad del detergente comercial ensayado.



## CAPÍTULO III

### 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Obtención de Resultados.

La evaluación de la eficiencia de biodegradación se realizó con los tres inóculos y tres repeticiones de cada uno, utilizando como muestras de estudio los detergentes (detergentes A, B, C, blanco y estándar), el primer análisis de las muestras se hizo a los 0 días, y este dato fue tomado como concentración inicial de detergente.

El segundo análisis se realizó una vez finalizada la incubación es decir a los 8 días, determinando la concentración de detergentes en las muestras incluyendo la corrección del blanco. Con estos datos se determinó el porcentaje de biodegradación, esto para cada uno de los inóculos empleados.

Finalizados los ensayos se determina el inóculo más eficiente para el proceso de biodegradabilidad de los detergentes comerciales.

Los resultados obtenidos de esta investigación se detallan a continuación:

- Tres ensayos con inóculo de muestra de agua de río, tomada de un punto de descarga de aguas residuales.
- Tres ensayos con inóculo de muestra de lodos activos, procedente de las plantas de tratamiento de aguas negras y grises.
- Tres ensayos con inóculo de cepa *E. coli*, previamente activada en el laboratorio.

**Tabla 1-3:** Prueba de biodegradabilidad con inóculo agua de río (primer ensayo).

CULTIVO BIODEGRADADOR			Descarga al río Napo			1 ml por cada 100 ml de muestra de incubación				
PRIMER ENSAYO			INCUBACIÓN 11-07-2017			EXTRACCIÓN COMO MBAS				Porcentaje Eliminación
Tiempo de Incubación	Identificación de la muestra	Peso de Detergente (g)	VOL DE M.C.	VOL MUESTRA	F.D.	Volumen Muestra ml	Dilución	Lectura Equipo mg/L	Concentr. Final mg/L	
0 DÍAS	Blanco	0	80	20	5	100	1	0,068	0,34	
	std 1,2 mg/L	0	80	20	5	100	1	0,35	1,75	
	DETERGENTE A	1,0010	80	20	5	100	20	1,803	180,30	
	DETERGENTE B	1,0023	80	20	5	100	20	1,739	173,90	
	DETERGENTE C	1,0012	80	20	5	100	10	1,746	87,30	
8 DÍAS	Blanco	0	80	20	5	100	1	0,035	0,18	
	std 1,2 mg/L	0	80	20	5	100	1	0,0966	0,48	78
	DETERGENTE A	1,0010	80	20	5	100	10	1,19938	59,97	67
	DETERGENTE B	1,0023	80	20	5	100	10	1,17026	58,51	66
	DETERGENTE C	1,0012	80	20	5	100	10	0,58422	29,21	67

**Realizado por:** Jessica Chinkim, 2017.

**Fuente:** Datos de determinación de detergentes y porcentaje de biodegradabilidad.

**Tabla 2-3:** Prueba de biodegradabilidad con inóculo agua de río (segundo ensayo).

CULTIVO BIODEGRADADOR			Descarga al río Napo			1 ml por cada 100 ml de muestra de incubación				
SEGUNDO ENSAYO			INCUBACIÓN 11-07-2017			EXTRACCIÓN COMO MBAS				Porcentaje Eliminación
Tiempo de Incubación	Identificación de la muestra		VOL DE M.C.	VOL MUESTRA	F.D.	Volumen Muestra ml	Dilución	Lectura Equipo mg/L	Concentr. Final mg/L	
0 DÍAS	Blanco	0	80	20	5	100	1	0,23	1,15	
	std 1,2 mg/L	0	80	20	5	100	1	0,466	2,33	
	DETERGENTE A	1,0045	80	20	5	100	20	1,892	189,20	
	DETERGENTE B	1,0008	80	20	5	100	20	1,601	160,10	
	DETERGENTE C	1,0032	80	20	5	100	10	1,664	83,20	
8 DÍAS	Blanco	0	80	20	5	100	1	0,039	0,20	
	std 1,2 mg/L	0	80	20	5	100	1	0,1022	0,51	73
	DETERGENTE A	1,0045	80	20	5	100	10	1,22304	61,15	68
	DETERGENTE B	1,0008	80	20	5	100	10	1,1375	56,88	64
	DETERGENTE C	1,0032	80	20	5	100	10	0,62062	31,03	62

**Realizado por:** Jessica Chinkim, 2017.

**Fuente:** Datos de determinación de detergentes y porcentaje de biodegradabilidad.

**Tabla 3-3:** Prueba de biodegradabilidad con inóculo agua de río (tercer ensayo).

CULTIVO BIODEGRADADOR			Descarga al río Napo			1 ml por cada 100 ml de muestra de incubación				
TERCER ENSAYO			INCUBACIÓN 11-07-2017			EXTRACCIÓN COMO MBAS				Porcentaje Eliminación
Tiempo de Incubación	Identificación de la muestra		VOL DE M.C.	VOL MUESTRA	F.D.	Volumen Muestra ml	Dilución	Lectura Equipo mg/L	Concentr. Final mg/L	
0 DÍAS	Blanco	0	80	20	5	100	1	0,213	1,07	
	std 1,2 mg/L	0	80	20	5	100	1	0,466	2,33	
	DETERGENTE A	1,0015	80	20	5	100	20	1,175	117,50	
	DETERGENTE B	1,0054	80	20	5	100	20	1,531	153,10	
	DETERGENTE C	1,0031	80	20	5	100	10	1,836	91,80	
8 DÍAS	Blanco	0	80	20	5	100	1	0,032	0,16	
	std 1,2 mg/L	0	80	20	5	100	1	0,108	0,54	82
	DETERGENTE A	1,0015	80	20	5	100	10	1,150	57,51	51
	DETERGENTE B	1,0054	80	20	5	100	10	1,292	64,61	58
	DETERGENTE C	1,0031	80	20	5	100	10	0,522	26,12	72

**Realizado por:** Jessica Chinkim, 2017.

**Fuente:** Datos de determinación de detergentes y porcentaje de biodegradabilidad.

**Tabla 4-3:** Prueba de biodegradabilidad con inóculo de lodos activos (primer ensayo).

CULTIVO BIODEGRADADOR			Lodo Activo			1 ml por cada 100ml de muestra a incubación				
PRIMER ENSAYO			INCUBACIÓN 20-07-2017			EXTRACCIÓN COMO MBAS				Porcentaje Eliminación
Tiempo de Incubación	Identificación de la muestra	Peso de Detergente (g)	VOL DE M.C.	VOL MUESTRA	F.D.	Volumen Muestra ml	Dilución	Lectura Equipo mg/L	Concentr. Final mg/L	
0 DÍAS	Blanco	0	80	20	5	100	1	0,068	0,34	
	std 1,2 mg/L	0	80	20	5	100	1	0,35	1,75	
	DETERGENTE A	1,0010	80	20	5	100	20	1,803	180,30	
	DETERGENTE B	1,0023	80	20	5	100	20	1,739	173,90	
	DETERGENTE C	1,0012	80	20	5	100	10	1,746	87,30	
8 DÍAS	Blanco	0	80	20	5	100	1	0,053	0,27	
	std 1,2 mg/L	0	80	20	5	100	1	0,085	0,43	89
	DETERGENTE A	1,0010	80	20	5	100	10	0,487	24,35	87
	DETERGENTE B	1,0023	80	20	5	100	10	0,676	33,80	81
	DETERGENTE C	1,0012	80	20	5	100	10	0,221	11,05	88

**Realizado por:** Jessica Chinkim, 2017.

**Fuente:** Datos de determinación de detergentes y porcentaje de biodegradabilidad.

**Tabla 5-3:** Prueba de biodegradabilidad con inóculo de lodos activos (segundo ensayo).

CULTIVO BIODEGRADADOR			Lodo Activo			1 ml por cada 100ml de muestra a incubación				
SEGUNDO ENSAYO			INCUBACIÓN 20-07-2017			EXTRACCIÓN COMO MBAS				Porcentaje Eliminación
Tiempo de Incubación	Identificación de la muestra	Peso de Detergente (g)	VOL DE M.C.	VOL MUESTRA	F.D.	Volumen Muestra ml	Dilución	Lectura Equipo mg/L	Concentr. Final mg/L	
0 DÍAS	Blanco	0	80	20	5	100	1	0,23	1,15	
	std 1,2 mg/L	0	80	20	5	100	1	0,466	2,33	
	DETERGENTE A	1,0045	80	20	5	100	20	1,892	189,20	
	DETERGENTE B	1,0008	80	20	5	100	20	1,601	160,10	
	DETERGENTE C	1,0032	80	20	5	100	10	1,664	83,20	
8 DÍAS	Blanco	0	80	20	5	100	1	0,034	0,17	
	std 1,2 mg/L	0	80	20	5	100	1	0,063	0,32	88
	DETERGENTE A	1,0045	80	20	5	100	10	0,565	28,25	85
	DETERGENTE B	1,0008	80	20	5	100	10	0,502	25,10	84
	DETERGENTE C	1,0032	80	20	5	100	10	0,187	9,35	89

**Realizado por:** Jessica Chinkim, 2017.

**Fuente:** Datos de determinación de detergentes y porcentaje de biodegradabilidad.

**Tabla 6-3:** Prueba de biodegradabilidad con inóculo de lodos activos (tercer ensayo).

CULTIVO BIODEGRADADOR			Lodo Activo			1 ml por cada 100ml de muestra a incubación				
TERCER ENSAYO			INCUBACIÓN 20-07-2017			EXTRACCIÓN COMO MBAS				Porcentaje Eliminación
Tiempo de Incubación	Identificación de la muestra	Peso de Detergente (g)	VOL DE M.C.	VOL MUESTRA	F.D.	Volumen Muestra ml	Dilución	Lectura Equipo mg/L	Concentr. Final mg/L	
0 DÍAS	Blanco	0	80	20	5	100	1	0,213	1,07	
	std 1,2 mg/L	0	80	20	5	100	1	0,466	2,33	
	DETERGENTE A	1,0015	80	20	5	100	20	1,175	117,50	
	DETERGENTE B	1,0054	80	20	5	100	20	1,531	153,10	
	DETERGENTE C	1,0031	80	20	5	100	10	1,836	91,80	
8 DÍAS	Blanco	0	80	20	5	100	1	0,036	0,18	
	std 1,2 mg/L	0	80	20	5	100	1	0,105	0,53	87
	DETERGENTE A	1,0015	80	20	5	100	10	0,465	23,25	80
	DETERGENTE B	1,0054	80	20	5	100	10	0,587	29,35	81
	DETERGENTE C	1,0031	80	20	5	100	10	0,253	12,65	86

**Realizado por:** Jessica Chinkim, 2017.

**Fuente:** Datos de determinación de detergentes y porcentaje de biodegradabilidad.

**Tabla 7-3:** Prueba de biodegradabilidad con inóculo cepa ATCC 25922 (primer ensayo).

CULTIVO BIODEGRADADOR			Cepa <i>E. coli</i>			1 ml por cada 100ml de muestra a incubación				
PRIMER ENSAYO			INCUBACIÓN 01-08-2017			EXTRACCIÓN COMO MBAS				Porcentaje Eliminación
Tiempo de Incubación	Identificación de la muestra	Peso de Detergente (g)	VOL DE M.C.	VOL MUESTRA	F.D.	Volumen Muestra ml	Dilución	Lectura Equipo mg/L	Concentr. Final mg/L	
0 DÍAS	Blanco	0	80	20	5	100	1	0,068	0,34	
	std 1,2 mg/L	0	80	20	5	100	1	0,35	1,75	
	DETERGENTE A	1,0010	80	20	5	100	20	1,803	180,30	
	DETERGENTE B	1,0023	80	20	5	100	20	1,689	168,90	
	DETERGENTE C	1,0012	80	20	5	100	10	1,746	87,30	
8 DÍAS	Blanco	0	80	20	5	100	1	0,042	0,21	
	std 1,2 mg/L	0	80	20	1	100	1	0,255	0,26	96,8
	DETERGENTE A	1,0010	80	20	5	100	10	0,332	16,60	90,9
	DETERGENTE B	1,0023	80	20	5	100	10	0,53	26,50	84,4
	DETERGENTE C	1,0012	80	20	5	100	1	0,506	2,53	97,3

**Realizado por:** Jessica Chinkim, 2017.

**Fuente:** Datos de determinación de detergentes y porcentaje de biodegradabilidad.



**Tabla 8-3:** Prueba de biodegradabilidad con inóculo cepa ATCC 25922 (segundo ensayo).

CULTIVO BIODEGRADADOR			Cepa <i>E. coli</i>			1 ml por cada 100ml de muestra a Incubación				
SEGUNDO ENSAYO			INCUBACIÓN 01-08-2017			EXTRACCIÓN COMO MBAS				Porcentaje Eliminación
Tiempo de Incubación	Identificación de la muestra		VOL DE M.C.	VOL MUESTRA	F.D.	Volumen Muestra ml	Dilución	Lectura Equipo mg/L	Concentr. Final mg/L	
0 DÍAS	Blanco	0	80	20	5	100	1	0,23	1,15	
	std 1,2 mg/L	0	80	20	5	100	1	0,466	2,33	
	DETERGENTE A	1,0045	80	20	5	100	20	1,892	189,20	
	DETERGENTE B	1,0008	80	20	5	100	20	1,601	160,10	
	DETERGENTE C	1,0032	80	20	5	100	10	1,664	83,20	
8 DÍAS	Blanco	0	80	20	5	100	1	0,061	0,31	
	std 1,2 mg/L	0	80	20	5	100	1	0,067	0,34	97
	DETERGENTE A	1,0045	80	20	5	100	10	0,401	20,05	89,5
	DETERGENTE B	1,0008	80	20	5	100	10	0,312	15,60	90
	DETERGENTE C	1,0032	80	20	5	100	1	0,34	1,70	98

**Realizado por:** Jessica Chinkim, 2017.

**Fuente:** Datos de determinación de detergentes y porcentaje de biodegradabilidad.

**Tabla 9-3:** Prueba de biodegradabilidad con inóculo cepa ATCC 25922 (tercer ensayo).

CULTIVO BIODEGRADADOR			Cepa <i>E. coli</i>			1 ml por cada 100ml de muestra a incubación				
TERCER ENSAYO			INCUBACIÓN 01-08-2017			EXTRACCIÓN COMO MBAS				Porcentaje Eliminación
Tiempo de Incubación	Identificación de la muestra		VOL DE M.C.	VOL MUESTRA	F.D.	Volumen Muestra ml	Dilución	Lectura Equipo mg/L	Concentr. Final mg/L	
0 DÍAS	Blanco	0	80	20	5	100	1	0,213	1,07	
	std 1,2 mg/L	0	80	20	5	100	1	0,466	2,33	
	DETERGENTE A	1,0015	80	20	5	100	20	1,175	117,50	
	DETERGENTE B	1,0054	80	20	5	100	20	1,531	153,10	
	DETERGENTE C	1,0031	80	20	5	100	10	1,836	91,80	
8 DÍAS	Blanco	0	80	20	5	100	1	0,055	0,28	
	std 1,2 mg/L	0	80	20	1	100	1	0,29	0,29	99
	DETERGENTE A	1,0015	80	20	5	100	10	0,303	15,15	87
	DETERGENTE B	1,0054	80	20	5	100	10	0,436	21,80	86
	DETERGENTE C	1,0031	80	20	5	100	1	0,77	3,85	96

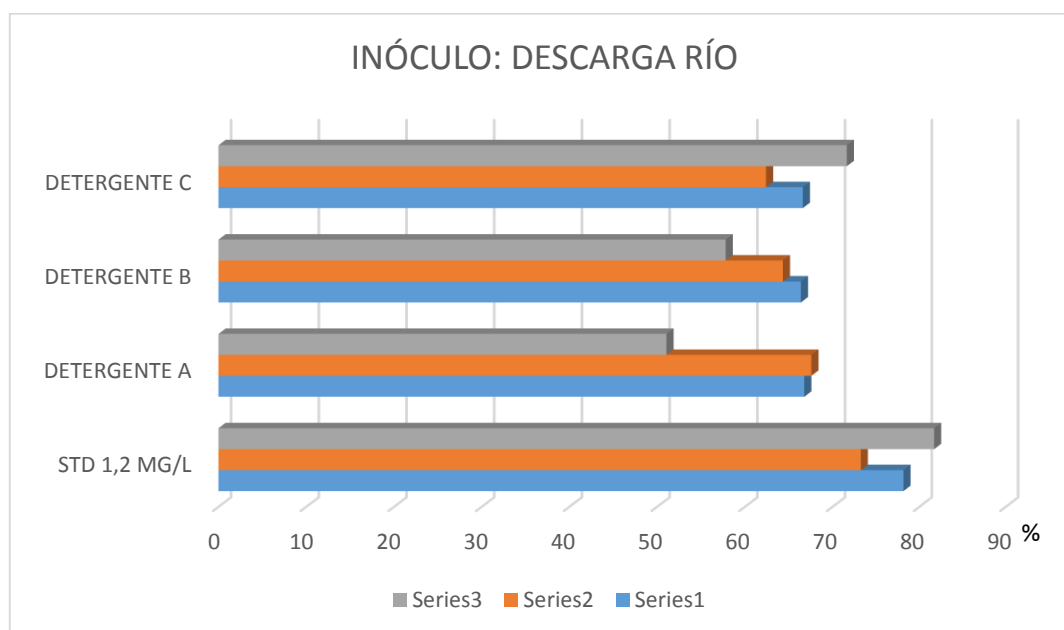
**Realizado por:** Jessica Chinkim, 2017.

**Fuente:** Datos de determinación de detergentes y porcentaje de biodegradabilidad.

**Tabla 10-3:** Resumen de los resultados obtenidos con los inóculos y tensoactivos ensayados.

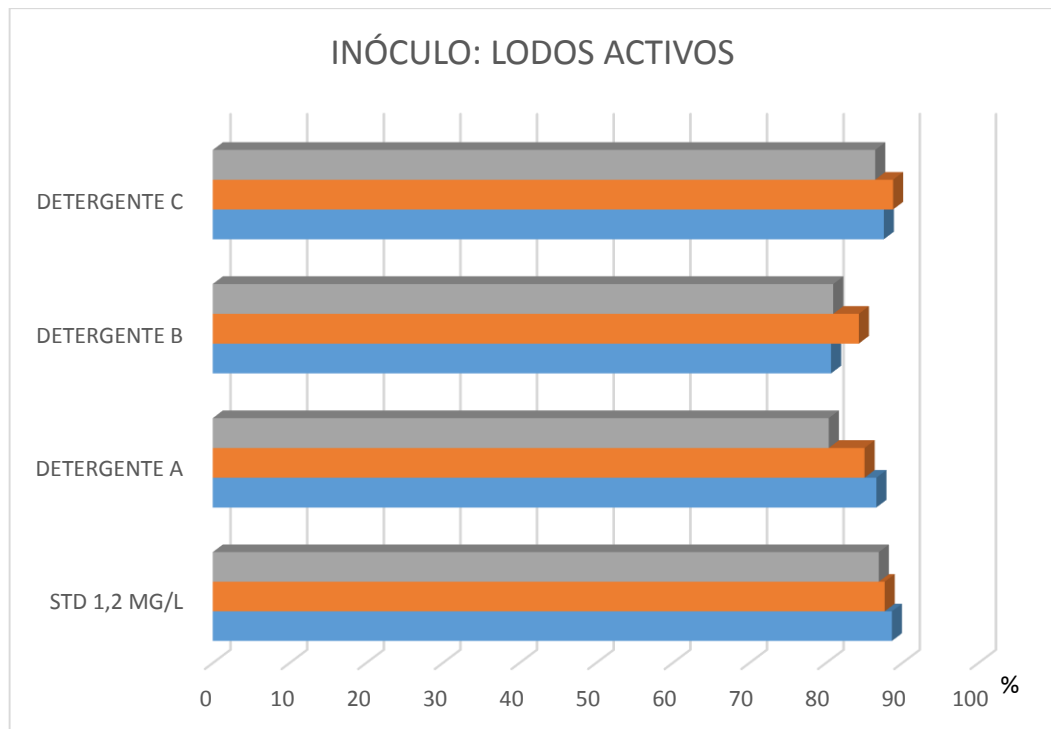
EFICIENCIA DE BIODEGRADACIÓN (%)								
INÓCULO	ENSAYOS	STD 1,2 MG/L	Eficiencia de biodegradación de microorganismos			Eficiencia de biodegradación de los detergentes		
			A	B	C	A	B	C
DESCARGA RÍO	1	78	67	66	67	61,82	62,06	66,93
	2	73	68	64	62			
	3	82	51	58	72			
LODOS ACTIVOS	1	89	87	81	88	83,93	81,91	87,44
	2	88	85	84	89			
	3	87	80	81	86			
CEPA <i>E. coli</i>	1	97	91	84	97	89,1	88,94	96,95
	2	97	89	90	98			
	3	99	87	86	96			

Realizado por: Jessica Chinkim, 2017.



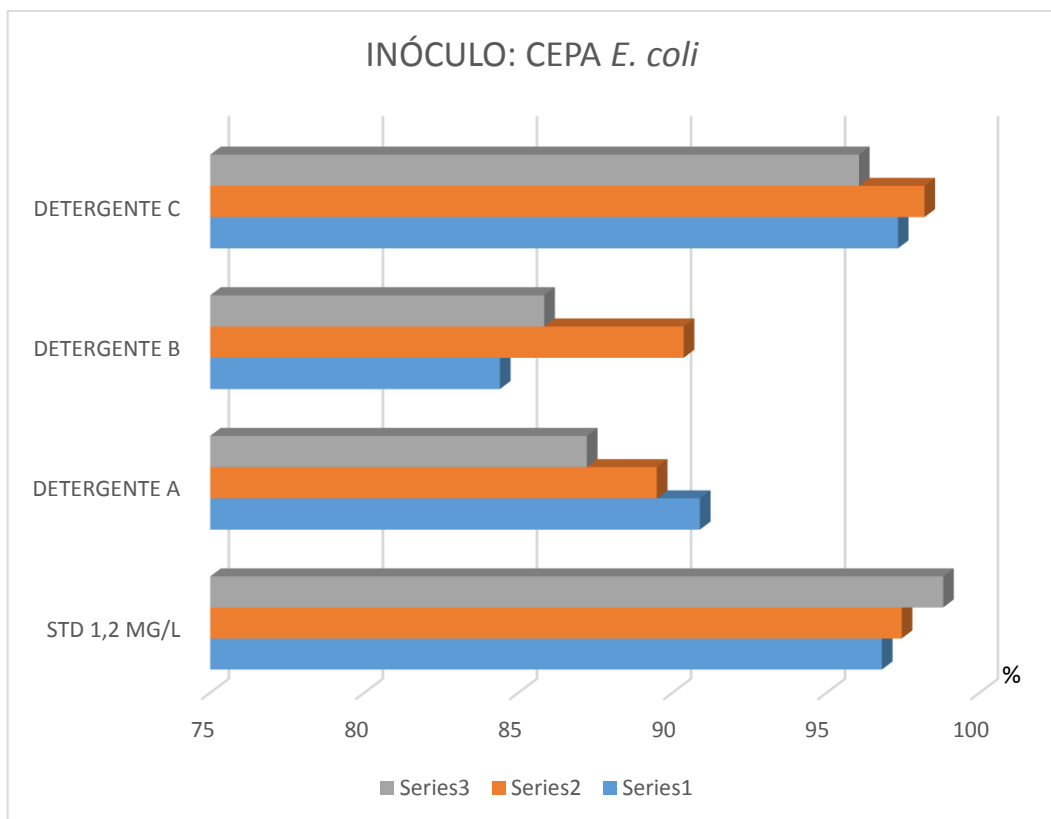
**Gráfico 1-3:** Porcentaje de biodegradación con el inóculo de descarga en río.

Realizado por: Jessica Chinkim, 2017.



**Gráfico 2-3:** Porcentaje de biodegradación con el inóculo de lodos activos.

**Realizado por:** Jessica Chinkim, 2017.



**Gráfico 3-3:** Porcentaje de biodegradación con el inóculo de cepa de *E. coli*.

**Realizado por:** Jessica Chinkim, 2017.

### 3.2 Discusión general de los resultados obtenidos.

Se llevaron a cabo estudios en los cuales se utilizó una misma cantidad de agentes tensoactivos (detergentes), éstos se escogieron sin poner mayor importancia en la marca, ya que los requisitos fisicoquímicos solicitados por el INEN en los tensoactivos lo común es la biodegradabilidad del 90 %, de ahí todos los detergentes tienen similar formulación, en lo que varían es en sus perfumes, estado, colorantes y algunos productos de relleno, pero se buscó que fuera un polvo, líquido y crema, para poder establecer las diferencias entre uno y otro tipo de detergente sintético.

La base de la tecnología de microorganismos eficiente (ME) es una mezcla de diferentes tipos de microorganismos, todos ellos benéficos, que poseen propiedades de fermentación, producción de sustancias bioactivas, competencia y antagonismo con patógenos, todo lo cual ayuda a mantener un equilibrio natural entre los microorganismos que conviven en el entorno, trayendo efectos positivos sobre la salud y bienestar del ecosistema, posibilitando que el agua servida de viviendas, ciudades y fábricas, entre otras, puedan ser tratadas de una manera que asegure que su retorno al medio ambiente se produzca de forma segura y pueda restaurar el balance ecológico del área (Romero y Vargas, 2017).

Por lo antes indicado, en este estudio se encontró que los porcentajes de biodegradabilidad más bajos se obtuvieron con los microorganismos nativos presentes en la descarga de río, 51 al 82% y en lodos activos, 80 al 89% y la más alta biodegradabilidad con la bacteria *E. coli* con el 99%. La más baja biodegradabilidad se debe posiblemente a que la cantidad de microorganismos fue menor en el momento de la toma de muestra, por ende la reproducción fue baja. Esto concuerda con lo manifestado por Frías y Garrido (2012), quienes dicen que, una acción depurativa en esos medios (ríos) ocurre por la acción de bacterias, que cuando detectan la presencia del contaminante (detergente) estas proliferan en número, se asume que este cambio se debe a la presencia de fosfato en el detergente, el cual es asimilado y metabolizado por las bacterias haciéndolas proliferar. Por otra parte, en los lodos activados a más de las bacterias encontramos otros microorganismos como los rotíferos, nematodos y en mayor cantidad los protozoarios que son los responsables de los procesos de descomposición (Zamora, 1995; Vilaseca et al. 1989; Moller y Tomasini, 2004). Por otro lado, la alta biodegradabilidad obtenida cuando se inoculó *E. coli* se debe a la cantidad de microorganismos al inicio del estudio, volviéndose a confirmar la teoría de Frías y Garrido en el año 2012. Soberón (2003) menciona, que esta bacteria posee importancia tanto clínica como biotecnológica, crece muy bien en detergentes recalcitrantes, debido a que produce algunos compuestos que le hacen útil en el tratamiento de la contaminación.

Por otro lado, en los tratamientos con descarga de agua de río y lodos activos se obtuvo un porcentaje de biodegradabilidad para los agentes tensoactivos (polvo, líquido y crema) inferior al 90 %, valores que no se ajustan a las normas técnicas recomendadas por el INEN en el año 2015 (INEN 849, 847 - método de ensayo ASTM D2667). Por otra parte, solo cuando se utilizó la cepa de *E. coli* aislada en el laboratorio se obtuvo valores entre el 90 y el 99% de biodegradabilidad, porcentaje aceptados por las normas INEN. A nivel de laboratorio para un control adecuado del ensayo, la eficiencia de biodegradación de cepa de *E. coli* es la más adecuada según lo expresan los resultados de ésta investigación.

Finalmente, se encontró que la mayor eficiencia de la biodegradación se logró en el lavavajilla (inóculo río) 67%, (inóculo lodos activos) 87% y 97% (inóculo *E. coli*). Esto se debe posiblemente a que la biodegradabilidad de los detergentes es muy variable, pues depende de la estructura química del ingrediente activo, los detergentes fabricados con sulfonato de alquilbenceno lineal (LAS) son biodegradables en condiciones aeróbicas pero resistentes en condiciones anaeróbicas (UC y Delgado, 2011). Actualmente, los tensoactivos más utilizados en la elaboración de detergentes son los aniónicos, los LAS comprenden más del 40% de los tensoactivos utilizados (Scout y Jones 2000).

## CONCLUSIONES

- Se evaluó la biodegradabilidad de tres tipos de detergentes comerciales: en líquido, polvo y lavavajillas (crema), utilizando tres inóculos: agua servidas descargadas al río, lodos activos y cepa *E. coli*, mediante el método de la norma ASTM D2667. Se comparó la eficiencia de biodegradabilidad de los microorganismos presentes en las aguas servidas descargadas al río, lodos activos y cepa *E. coli*, obteniéndose los siguientes resultados de biodegradabilidad: del 51 al 82 % con el inóculo de descarga de aguas servidas en el río; del 80 al 89 % con inóculo de lodos activos y con el inóculo de la cepa de *E. coli* el 99 %, este último inóculo siendo el más efectivo.
- Se obtuvo una eficiencia de biodegradabilidad en el detergente líquido de 61,82% a 89,1%; polvo 62,06% a 88,94% y lavavajillas (crema) 66,93% a 96,95%, siendo este último el que más se biodegradó.
- Mediante el empleo y desarrollo de las normas ASTM D2667 y ASTM D2330, se elaboró un manual de procedimiento, para la determinación del porcentaje de biodegradabilidad del tensoactivo en detergentes, al cual según el listado de instructivos de ensayos del Sistema de Gestión de Calidad el Laboratorio AqLab se le asignó el código ITE-AQLAB-35.

## RECOMENDACIONES

- El laboratorio AqLab debe considerar este método de ensayo como ITE-AQLAB-35, para ser validado mediante su procedimiento interno para este fin, luego de cumplir con estos criterios establecidos sea testificado, evaluado y acreditado por el Servicio de Acreditación Ecuatoriano (SAE).
- Preparar los reactivos tanto para la incubación y extracción el mismo día del ensayo, ya que estas soluciones no son muy estables, para asegurar la calidad de los ensayos y resultados.
- Al trabajar con inóculos de alta carga microbiana, ácidos, bases, y solventes, se deben adoptar todas las medidas de seguridad e higiene para evitar algún riesgo de intoxicación, inhalación y/o quemado del analista.
- En la etapa de extracción y determinación de la concentración de LAS (mg/l), se debe tener mucho cuidado en el lavado y enjuague del material de vidrio, ya que una mínima cantidad de residuos puede ocasionar resultados elevados y erróneos.











## BIBLIOGRAFÍA

1. **ALLAN , R, FÖRSTNER, U y SALOMONS, W.** *Environmental Science*. New York : Springer Berlin Heidelberg New York, 2014. 3-540-22210-3.
2. **ANSARI, Abid y SINGH, Sarvajeet.** *Eutrophication: causes, consequences and control*. s.l. : Springer Dordrecht Heidelberg London New York, 2014. Vol. II. ISBN 978-94-007-7814-6.
3. **ASTM D2330.** *Método de Prueba Estándar de Sustancias Activas de Azul de Metileno*.
4. **ASTM D2667.** *Método de Prueba Estándar para Biodegradabilidad del Alquilbencenosulfonatos*.
5. **BROZE , Guy.** *HANDBOOK OF DETERGENTS: Properties*. Estados Unidos de América : Marcel Dekker, 2008. ISBN 0-8247-1417-2.
6. **FRÍAS JERALDO JOSÉ & GARRIDO SAEZ NICOLÁS.** *Biorremediación de aguas contaminadas con detergente por medio de bacterias quimiosintetizadoras*. [En línea] [Citado el: 25 de Noviembre de 2017.] [http://www.juniordelagua.cl/archivos\\_recursos/phpBf0Msy.pdf](http://www.juniordelagua.cl/archivos_recursos/phpBf0Msy.pdf).
7. **HAYES, Douglas, y otros.** *Biobased Surfactants and Detergents Synthesis, Properties, and Applications*. New York : AOCS Press, 2009. ISBN 978-1-893997-67-7.
8. **HUTZINGER, O.** *Detergents*. Berlin : Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH, 2008. Vol. III. ISBN 978-3-540-47108-0.
9. **INEN 849.** *Agentes tensoactivo.Detergente en polvo para uso doméstico*.
10. **ROMERO, Teresita y VARGAS, Dabiel.** *Uso de microorganismo eficientes para tratar aguas contaminadas*. [En línea] [Citado el: 25 de Noviembre de 2017.] [http://scielo.sld.cu/scielophp?script=sci\\_arttex&pid=S1680-03382017000300008](http://scielo.sld.cu/scielophp?script=sci_arttex&pid=S1680-03382017000300008).
11. **SCHICK, M.** *HANDBOOK OF DETERGENTS: Applications*. New York : CRC Press, 2012. ISBN 978-1-57444-757-6.
12. **SCHWUGER, M.** *Detergents in the Environment Surfactant Science*. New York : CRC Press, 1997. ISBN 97-8058-367651.

13. **SINGH, A y WARD, O.** *Applied Bioremediation and Phytoremediation*. New York : Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013. ISBN 978-3-662-05794-0.
14. **SOBERÓN, Gloria.** *Una bacteria fascinante y temible*. [En línea] [Citado el: 25 de Noviembre de 2017.] <http://www.crya.unam.mx/-jane/coloquio/2008/gsoberon.html>.
15. **TOMASINI, Ana y MOELLER, Gabriela.** *Microbiología de lodos activados*. [En línea] [Citado el: 25 de Noviembre de 2017.] <http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/018834/MEMORIAS2004/CapituloII/5Microbiologiadelodosactivados.pdf>.
16. **URI, Zoller.** *HANDBOOK OF DETERGENTS: Production*. New York : CRC Press, 2012. ISBN 978-0-8247-0349-3.
17. **VILLASECA, M.** *Identificación taxonómica de las bacterias propias de los fangos activados en una depuradora piloto de agua residual textil*. [En línea] [Citado el: 25 de Noviembre de 2017.] <http://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099/6288/Article05.pdf?sequence=1>.
18. **WALDHOFF, Heinrich y SPILKER, Rüüiger.** *HANDBOOK OF DETERGENTS: Analysis*. New York : Marcel Dekker, 2010. ISBN 0-8247-0351-0.
19. **ZAMORA, María.** *Efectos de algunos detergentes sobre los protozoarios provenientes en los lodos activados de una planta de tratamiento*. [En línea] [Citado el: 25 de Noviembre de 2017.] <http://eprints.uanl.mx/7563/1/1020112545.PDF>.

## ANEXOS

### Anexo A. Registro fotográfico de las actividades realizadas

	
<p>1. Control de Condiciones Ambientales (Área Instrumental)</p>	<p>2. Control y registro de condiciones Ambientales (Área de Incubación) DATA LOGGER</p>
	
<p>3. Reactivos empleados para la investigación.</p>	<p>4. Preparación de la solución de los detergentes</p>
	
<p>5. Recuento de <i>E. coli</i>, en lodos activos</p>	<p>6. Cepa <i>E. coli</i> activa</p>
	
<p>7. Inicio del proceso de extracción (Indicador de ácido-base con fenolftaleína)</p>	<p>8. Proceso de extracción (Azul de Metileno y cloroformo)</p>



9. Filtración de los estándares para la curva de calibración



10. Lectura de las extracciones en el equipo UV VIS



11. Ensayo de extracción de los detergentes a los 0 días (inicial)



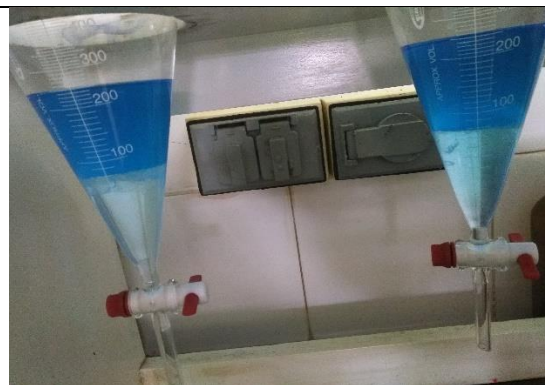
12. Ensayo de Extracción de los detergentes a los 8 días (final)



13. Adición de reactivos para la extracción (Derecha muestras de detergentes – Izquierda Estándares de calibración)



14. Agitación con Azul de Metileno y Cloroformo



15. Separación de las fases Agua (arriba) – Solvente (abajo extracto)



## Diseño Experimental



### 16. Detergentes a ensayar

*Detergente A, Detergente B, Detergente C.*

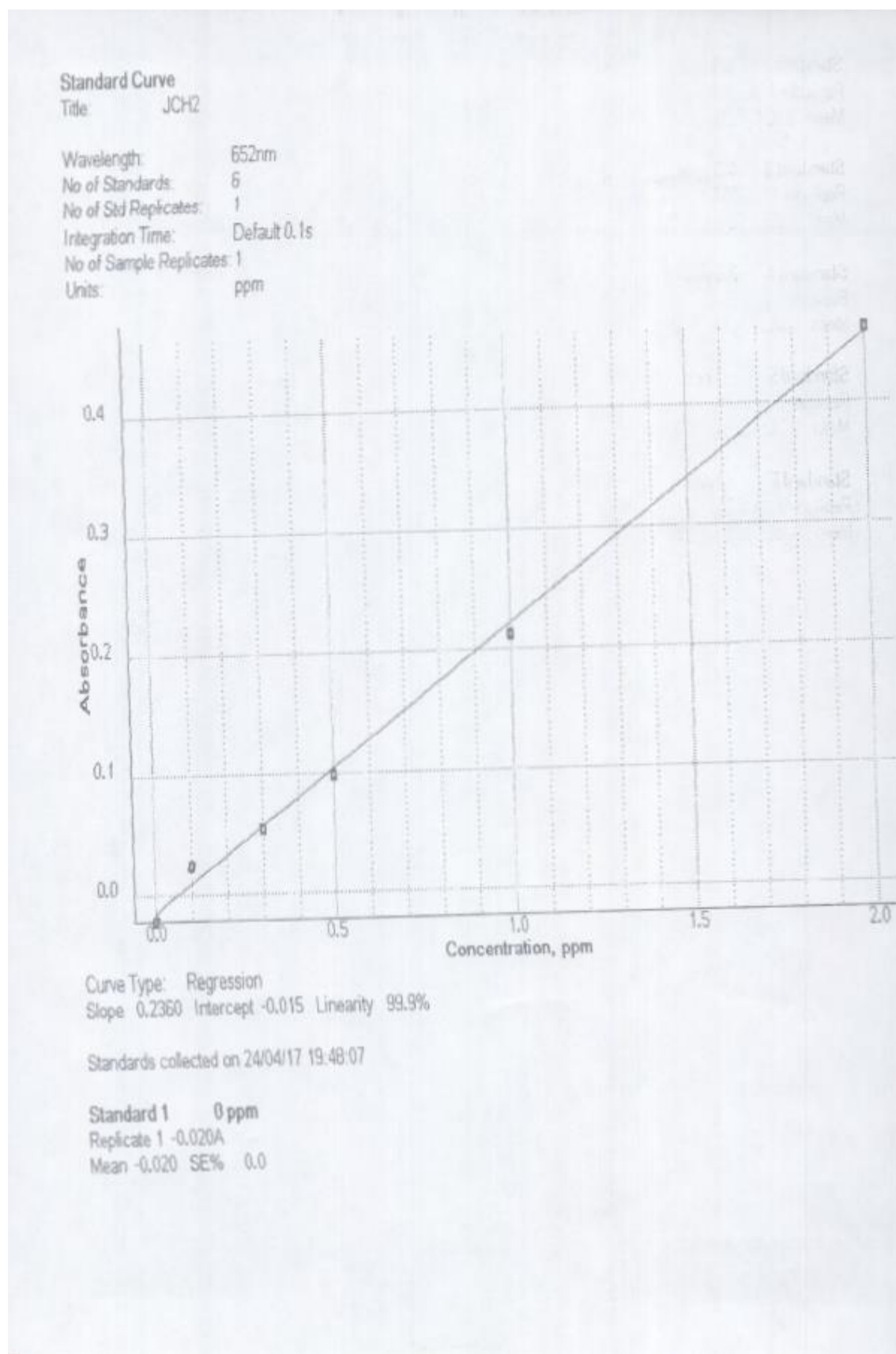


### 17. Toma de muestra de agua del río Napo



### 18. Recuento de *Coliformes Fecales* y *E. coli* en la muestra de lodos activos

**Anexo B.** Curva de calibración para determinar la concentración de tensoactivos en mg/L.



Standard 2 0.1 ppm  
Replicate 1 0.024A  
Mean 0.024 SE% 0.0

Standard 3 0.3 ppm  
Replicate 1 0.055A  
Mean 0.055 SE% 0.0

Standard 4 0.5 ppm  
Replicate 1 0.099A  
Mean 0.099 SE% 0.0

Standard 5 1 ppm  
Replicate 1 0.212A  
Mean 0.212 SE% 0.0

Standard 6 2 ppm  
Replicate 1 0.462A  
Mean 0.462 SE% 0.0

**Anexo C.** Registro del control de temperatura en las condiciones específicas durante la incubación (Primer Ensayo).

<b>No</b>	<b>Fecha</b>	<b>Hora</b>	<b>T1/T2</b>	<b>Value</b>	<b>Unit</b>	<b>Judge</b>
1	30/5/2017	16:00:00	T1	25,9	°C	Pass
2	30/5/2017	17:56:22	T1	25,9	°C	Pass
3	30/5/2017	19:52:44	T1	25,9	°C	Pass
4	30/5/2017	21:49:06	T1	25,7	°C	Pass
5	30/5/2017	23:45:28	T1	25,6	°C	Pass
6	31/5/2017	1:41:50	T1	25	°C	Pass
7	31/5/2017	3:38:12	T1	25	°C	Pass
8	31/5/2017	5:34:34	T1	25,4	°C	Pass
9	31/5/2017	7:30:56	T1	26,1	°C	Pass
10	31/5/2017	9:27:18	T1	26,2	°C	Pass
11	31/5/2017	11:23:40	T1	26,4	°C	Pass
12	31/5/2017	13:20:02	T1	26,7	°C	Pass
13	31/5/2017	15:16:24	T1	26,9	°C	Pass
14	31/5/2017	17:12:46	T1	26,9	°C	Pass
15	31/5/2017	19:09:08	T1	27	°C	Pass
16	31/5/2017	21:05:30	T1	27	°C	Pass
17	31/5/2017	23:01:52	T1	27,1	°C	Pass
18	1/6/2017	0:58:14	T1	27,2	°C	Pass
19	1/6/2017	2:54:36	T1	27,3	°C	Pass
20	1/6/2017	4:50:58	T1	27,4	°C	Pass
21	1/6/2017	6:47:20	T1	27,5	°C	Pass
22	1/6/2017	8:43:42	T1	27,5	°C	Pass
23	1/6/2017	10:40:04	T1	27,6	°C	Pass
24	1/6/2017	12:36:26	T1	27,6	°C	Pass
25	1/6/2017	14:32:48	T1	27,6	°C	Pass
26	1/6/2017	16:29:10	T1	27,8	°C	Pass
27	1/6/2017	18:25:32	T1	27,7	°C	Pass
28	1/6/2017	20:21:54	T1	27,7	°C	Pass
29	1/6/2017	22:18:16	T1	27,8	°C	Pass
30	2/6/2017	0:14:38	T1	27,9	°C	Pass
31	2/6/2017	2:11:00	T1	28	°C	Pass
32	2/6/2017	4:07:22	T1	27,6	°C	Pass
33	2/6/2017	6:03:44	T1	27,9	°C	Pass
34	2/6/2017	8:00:06	T1	27,6	°C	Pass
35	2/6/2017	9:56:28	T1	27,6	°C	Pass
36	2/6/2017	11:52:50	T1	27,5	°C	Pass
37	2/6/2017	13:49:12	T1	27,6	°C	Pass
38	2/6/2017	15:45:34	T1	27,4	°C	Pass
39	2/6/2017	17:41:56	T1	27,4	°C	Pass
40	2/6/2017	19:38:18	T1	27,5	°C	Pass
41	2/6/2017	21:34:40	T1	27,5	°C	Pass



42	2/6/2017	23:31:02	T1	27,6	°C	Pass
43	3/5/2017	1:27:24	T1	27,5	°C	Pass
44	3/5/2017	3:23:46	T1	27,4	°C	Pass
45	3/5/2017	5:20:08	T1	27,6	°C	Pass
46	3/5/2017	7:16:30	T1	27,3	°C	Pass
47	3/5/2017	9:12:52	T1	27,4	°C	Pass
48	3/5/2017	11:09:14	T1	27,3	°C	Pass
49	3/5/2017	13:05:36	T1	27,3	°C	Pass
50	3/5/2017	15:01:58	T1	27,3	°C	Pass
51	3/5/2017	16:58:20	T1	27,4	°C	Pass
52	3/5/2017	18:54:42	T1	27,3	°C	Pass
53	3/5/2017	20:51:04	T1	27,2	°C	Pass
54	3/5/2017	22:47:26	T1	27,4	°C	Pass
55	4/6/2017	0:43:48	T1	27,4	°C	Pass
56	4/6/2017	2:40:10	T1	27,2	°C	Pass
57	4/6/2017	4:36:32	T1	27,3	°C	Pass
58	4/6/2017	6:32:54	T1	27,1	°C	Pass
59	4/6/2017	8:29:16	T1	27,2	°C	Pass
60	4/6/2017	10:25:38	T1	27,1	°C	Pass
61	4/6/2017	12:22:00	T1	27,2	°C	Pass
62	4/6/2017	14:18:22	T1	27,2	°C	Pass
63	4/6/2017	16:14:44	T1	27,3	°C	Pass
64	4/6/2017	18:11:06	T1	27,4	°C	Pass
65	4/6/2017	20:07:28	T1	27,3	°C	Pass
66	4/6/2017	22:03:50	T1	27,5	°C	Pass
67	5/6/2017	0:00:12	T1	27,2	°C	Pass
68	5/6/2017	1:56:34	T1	26,9	°C	Pass
69	5/6/2017	3:52:56	T1	26,1	°C	Pass
70	5/6/2017	5:49:18	T1	26,3	°C	Pass
71	5/6/2017	7:45:40	T1	25,8	°C	Pass
72	5/6/2017	9:42:02	T1	25,4	°C	Pass
73	5/6/2017	11:38:24	T1	24,8	°C	Pass
74	5/6/2017	13:34:46	T1	25,5	°C	Pass
75	5/6/2017	15:31:08	T1	24,9	°C	Pass
76	5/6/2017	17:27:30	T1	25,3	°C	Pass
77	5/6/2017	19:23:52	T1	25,4	°C	Pass
78	5/6/2017	21:20:14	T1	25,6	°C	Pass
79	5/6/2017	23:16:36	T1	25	°C	Pass
80	6/6/2017	1:12:58	T1	25	°C	Pass
81	6/6/2017	3:09:20	T1	24,9	°C	Pass
82	6/6/2017	5:05:42	T1	25,2	°C	Pass
83	6/6/2017	7:02:04	T1	25,5	°C	Pass
84	6/6/2017	8:58:26	T1	25,6	°C	Pass
85	6/6/2017	10:54:48	T1	25,9	°C	Pass
86	6/6/2017	12:51:10	T1	25,9	°C	Pass

<b>87</b>	6/6/2017	14:47:32	T1	25,7	°C	Pass
<b>88</b>	6/6/2017	16:43:54	T1	25,8	°C	Pass
<b>89</b>	6/6/2017	18:40:16	T1	25,9	°C	Pass
<b>90</b>	6/6/2017	20:36:38	T1	25,8	°C	Pass
<b>91</b>	6/6/2017	22:33:00	T1	25,8	°C	Pass
<b>92</b>	7/6/2017	0:29:22	T1	25,9	°C	Pass
<b>93</b>	7/6/2017	2:25:44	T1	25,9	°C	Pass
<b>94</b>	7/6/2017	4:22:06	T1	25,7	°C	Pass
<b>95</b>	7/6/2017	6:18:28	T1	25,9	°C	Pass
<b>96</b>	7/6/2017	8:14:50	T1	25,8	°C	Pass
<b>97</b>	7/6/2017	10:11:12	T1	25,4	°C	Pass
<b>98</b>	7/6/2017	12:07:34	T1	25,4	°C	Pass
<b>99</b>	7/6/2017	14:03:56	T1	26,9	°C	Pass

**Anexo D.** Registro del control de temperatura en las condiciones específicas durante la incubación (Segundo ensayo).

<b>No</b>	<b>FECHA</b>	<b>HORA</b>	<b>T1/T2</b>	<b>Value</b>	<b>Unit</b>	<b>Judge</b>
1	23/6/2017	12:00:00	T1	24,5	°C	Pass
2	23/6/2017	13:56:22	T1	24,8	°C	Pass
3	23/6/2017	15:52:44	T1	23,7	°C	Pass
4	23/6/2017	17:49:06	T1	24,4	°C	Pass
5	23/6/2017	19:45:28	T1	24,4	°C	Pass
6	23/6/2017	21:41:50	T1	25,3	°C	Pass
7	23/6/2017	23:38:12	T1	24,8	°C	Pass
8	24/6/2017	1:34:34	T1	25,4	°C	Pass
9	24/6/2017	3:30:56	T1	25,4	°C	Pass
10	24/6/2017	5:27:18	T1	25,4	°C	Pass
11	24/6/2017	7:23:40	T1	25,8	°C	Pass
12	24/6/2017	9:20:02	T1	26,2	°C	Pass
13	24/6/2017	11:16:24	T1	26,6	°C	Pass
14	24/6/2017	13:12:46	T1	26,9	°C	Pass
15	24/6/2017	15:09:08	T1	26,9	°C	Pass
16	24/6/2017	17:05:30	T1	26,1	°C	Pass
17	24/6/2017	19:01:52	T1	26,1	°C	Pass
18	24/6/2017	20:58:14	T1	26,3	°C	Pass
19	24/6/2017	22:54:36	T1	25,4	°C	Pass
20	25/6/2017	0:50:58	T1	25,6	°C	Pass
21	25/6/2017	2:47:20	T1	25,5	°C	Pass
22	25/6/2017	4:43:42	T1	25,4	°C	Pass
23	25/6/2017	6:40:04	T1	24,5	°C	Pass
24	25/6/2017	8:36:26	T1	24,6	°C	Pass
25	25/6/2017	10:32:48	T1	24,3	°C	Pass
26	25/6/2017	12:29:10	T1	24,6	°C	Pass
27	25/6/2017	14:25:32	T1	24,4	°C	Pass
28	25/6/2017	16:21:54	T1	24,7	°C	Pass
29	25/6/2017	18:18:16	T1	25	°C	Pass
30	25/6/2017	20:14:38	T1	24,6	°C	Pass
31	25/6/2017	22:11:00	T1	24,6	°C	Pass
32	26/6/2017	0:07:22	T1	24,8	°C	Pass
33	26/6/2017	2:03:44	T1	24,1	°C	Pass
34	26/6/2017	4:00:06	T1	25,5	°C	Pass
35	26/6/2017	5:56:28	T1	26,2	°C	Pass
36	26/6/2017	7:52:50	T1	26,4	°C	Pass
37	26/6/2017	9:49:12	T1	26,8	°C	Pass
38	26/6/2017	11:45:34	T1	26,9	°C	Pass
39	26/6/2017	13:41:56	T1	27,1	°C	Pass
40	26/6/2017	15:38:18	T1	27,2	°C	Pass
41	26/6/2017	17:34:40	T1	27,2	°C	Pass

42	26/6/2017	19:31:02	T1	27,4	°C	Pass
43	26/6/2017	21:27:24	T1	27,5	°C	Pass
44	26/6/2017	23:23:46	T1	27,6	°C	Pass
45	27/6/2017	1:20:08	T1	26,6	°C	Pass
46	27/6/2017	3:16:30	T1	26,4	°C	Pass
47	27/6/2017	5:12:52	T1	26,1	°C	Pass
48	27/6/2017	7:09:14	T1	25,8	°C	Pass
49	27/6/2017	9:05:36	T1	25,6	°C	Pass
50	27/6/2017	11:01:58	T1	25,5	°C	Pass
51	27/6/2017	12:58:20	T1	25,7	°C	Pass
52	27/6/2017	14:54:42	T1	25,3	°C	Pass
53	27/6/2017	16:51:04	T1	24,9	°C	Pass
54	27/6/2017	18:47:26	T1	25	°C	Pass
55	27/6/2017	20:43:48	T1	25,1	°C	Pass
56	27/6/2017	22:40:10	T1	25,3	°C	Pass
57	28/6/2017	0:36:32	T1	25,6	°C	Pass
58	28/6/2017	2:32:54	T1	25,4	°C	Pass
59	28/6/2017	4:29:16	T1	25,3	°C	Pass
60	28/6/2017	6:25:38	T1	25,5	°C	Pass
61	28/6/2017	8:22:00	T1	25,3	°C	Pass
62	28/6/2017	10:18:22	T1	25,2	°C	Pass
63	28/6/2017	12:14:44	T1	25,7	°C	Pass
64	28/6/2017	14:11:06	T1	25,5	°C	Pass
65	28/6/2017	16:07:28	T1	25,5	°C	Pass
66	28/6/2017	18:03:50	T1	25,9	°C	Pass
67	28/6/2017	20:00:12	T1	27,6	°C	Pass
68	28/6/2017	21:56:34	T1	26,3	°C	Pass
69	28/6/2017	23:52:56	T1	25,5	°C	Pass
70	29/6/2017	1:49:18	T1	25,4	°C	Pass
71	29/6/2017	3:45:40	T1	25,7	°C	Pass
72	29/6/2017	5:42:02	T1	25,8	°C	Pass
73	29/6/2017	7:38:24	T1	25,9	°C	Pass
74	29/6/2017	9:34:46	T1	25,7	°C	Pass
75	29/6/2017	11:31:08	T1	25,6	°C	Pass
76	29/6/2017	13:27:30	T1	26,6	°C	Pass
77	29/6/2017	15:23:52	T1	25,3	°C	Pass
78	29/6/2017	17:20:14	T1	23,8	°C	Pass
79	29/6/2017	19:16:36	T1	24,1	°C	Pass
80	29/6/2017	21:12:58	T1	24,6	°C	Pass
81	29/6/2017	23:09:20	T1	24,4	°C	Pass
82	30/6/2017	1:05:42	T1	24,8	°C	Pass
83	30/6/2017	3:02:04	T1	25,2	°C	Pass
84	30/6/2017	4:58:26	T1	24,9	°C	Pass
85	30/6/2017	6:54:48	T1	24,5	°C	Pass
86	30/6/2017	8:51:10	T1	25,3	°C	Pass

<b>87</b>	30/6/2017	10:47:32	T1	24,9	°C	Pass
<b>88</b>	30/6/2017	12:43:54	T1	25,3	°C	Pass
<b>89</b>	30/6/2017	14:40:16	T1	25,2	°C	Pass
<b>90</b>	30/6/2017	16:36:38	T1	25,4	°C	Pass
<b>91</b>	30/6/2017	18:33:00	T1	25,3	°C	Pass
<b>92</b>	30/6/2017	20:29:22	T1	25	°C	Pass
<b>93</b>	30/6/2017	22:25:44	T1	24,9	°C	Pass
<b>94</b>	1/7/2017	0:22:06	T1	24,9	°C	Pass
<b>95</b>	1/7/2017	2:18:28	T1	24,8	°C	Pass
<b>96</b>	1/7/2017	4:14:50	T1	24,8	°C	Pass
<b>97</b>	1/7/2017	6:11:12	T1	25,3	°C	Pass
<b>98</b>	1/7/2017	8:07:34	T1	25,2	°C	Pass
<b>99</b>	1/7/2017	10:03:56	T1	25,5	°C	Pass

**Anexo E.** Registro del control de temperatura en las condiciones específicas durante la incubación (Tercer ensayo).

<b>No</b>	<b>FECHA</b>	<b>HORA</b>	<b>T1/T2</b>	<b>Value</b>	<b>Unit</b>	<b>Judge</b>
1	11/7/2017	9:00:00	T1	27,3	°C	Pass
2	11/7/2017	10:56:22	T1	27,2	°C	Pass
3	11/7/2017	12:52:44	T1	27,3	°C	Pass
4	11/7/2017	14:49:06	T1	27,4	°C	Pass
5	11/7/2017	16:45:28	T1	27,7	°C	Pass
6	11/7/2017	18:41:50	T1	27,7	°C	Pass
7	11/7/2017	20:38:12	T1	27,6	°C	Pass
8	11/7/2017	22:34:34	T1	27,8	°C	Pass
9	12/7/2017	0:30:56	T1	27,8	°C	Pass
10	12/7/2017	2:27:18	T1	27,9	°C	Pass
11	12/7/2017	4:23:40	T1	28	°C	Pass
12	12/7/2017	6:20:02	T1	28	°C	Pass
13	12/7/2017	8:16:24	T1	27,9	°C	Pass
14	12/7/2017	10:12:46	T1	27,9	°C	Pass
15	12/7/2017	12:09:08	T1	27,9	°C	Pass
16	12/7/2017	14:05:30	T1	27,9	°C	Pass
17	12/7/2017	16:01:52	T1	27,8	°C	Pass
18	12/7/2017	17:58:14	T1	27,8	°C	Pass
19	12/7/2017	19:54:36	T1	27,8	°C	Pass
20	12/7/2017	21:50:58	T1	27,9	°C	Pass
21	12/7/2017	23:47:20	T1	27,8	°C	Pass
22	13/7/2017	1:43:42	T1	27,7	°C	Pass
23	13/7/2017	3:40:04	T1	27,9	°C	Pass
24	13/7/2017	5:36:26	T1	27,8	°C	Pass
25	13/7/2017	7:32:48	T1	27,7	°C	Pass
26	13/7/2017	9:29:10	T1	27,9	°C	Pass
27	13/7/2017	11:25:32	T1	27,8	°C	Pass
28	13/7/2017	13:21:54	T1	27,7	°C	Pass
29	13/7/2017	15:18:16	T1	27,9	°C	Pass
30	13/7/2017	17:14:38	T1	27,7	°C	Pass
31	13/7/2017	19:11:00	T1	27,8	°C	Pass
32	13/7/2017	21:07:22	T1	27,8	°C	Pass
33	13/7/2017	23:03:44	T1	27,8	°C	Pass
34	14/7/2017	1:00:06	T1	27,7	°C	Pass
35	14/7/2017	2:56:28	T1	27,9	°C	Pass
36	14/7/2017	4:52:50	T1	27,9	°C	Pass
37	14/7/2017	6:49:12	T1	27,9	°C	Pass
38	14/7/2017	8:45:34	T1	27,9	°C	Pass
39	14/7/2017	10:41:56	T1	27,9	°C	Pass
40	14/7/2017	12:38:18	T1	27,7	°C	Pass
41	14/7/2017	14:34:40	T1	27,7	°C	Pass

42	14/7/2017	16:31:02	T1	27,7	°C	Pass
43	14/7/2017	18:27:24	T1	27,7	°C	Pass
44	14/7/2017	20:23:46	T1	27,8	°C	Pass
45	14/7/2017	22:20:08	T1	27,7	°C	Pass
46	15/7/2017	0:16:30	T1	27,8	°C	Pass
47	15/7/2017	2:12:52	T1	27,7	°C	Pass
48	15/7/2017	4:09:14	T1	27,5	°C	Pass
49	15/7/2017	6:05:36	T1	27,7	°C	Pass
50	15/7/2017	8:01:58	T1	27,6	°C	Pass
51	15/7/2017	9:58:20	T1	27,7	°C	Pass
52	15/7/2017	11:54:42	T1	27,7	°C	Pass
53	15/7/2017	13:51:04	T1	27,6	°C	Pass
54	15/7/2017	15:47:26	T1	27,6	°C	Pass
55	15/7/2017	17:43:48	T1	27,7	°C	Pass
56	15/7/2017	19:40:10	T1	27,7	°C	Pass
57	15/7/2017	21:36:32	T1	27,7	°C	Pass
58	15/7/2017	23:32:54	T1	27,5	°C	Pass
59	16/7/2017	1:29:16	T1	27,6	°C	Pass
60	16/7/2017	3:25:38	T1	27,5	°C	Pass
61	16/7/2017	5:22:00	T1	27,4	°C	Pass
62	16/7/2017	7:18:22	T1	27,4	°C	Pass
63	16/7/2017	9:14:44	T1	27,3	°C	Pass
64	16/7/2017	11:11:06	T1	27,7	°C	Pass
65	16/7/2017	13:07:28	T1	27,4	°C	Pass
66	16/7/2017	15:03:50	T1	27,5	°C	Pass
67	16/7/2017	17:00:12	T1	27,4	°C	Pass
68	16/7/2017	18:56:34	T1	27,4	°C	Pass
69	16/7/2017	20:52:56	T1	27,6	°C	Pass
70	16/7/2017	22:49:18	T1	27,4	°C	Pass
71	17/7/2017	0:45:40	T1	27,4	°C	Pass
72	17/7/2017	2:42:02	T1	27,3	°C	Pass
73	17/7/2017	4:38:24	T1	27,3	°C	Pass
74	17/7/2017	6:34:46	T1	27,4	°C	Pass
75	17/7/2017	8:31:08	T1	27,4	°C	Pass
76	17/7/2017	10:27:30	T1	27,4	°C	Pass
77	17/7/2017	12:23:52	T1	27,3	°C	Pass
78	17/7/2017	14:20:14	T1	27,3	°C	Pass
79	17/7/2017	16:16:36	T1	27,3	°C	Pass
80	17/7/2017	18:12:58	T1	27,4	°C	Pass
81	17/7/2017	20:09:20	T1	27,2	°C	Pass
82	17/7/2017	22:05:42	T1	27	°C	Pass
83	18/7/2017	0:02:04	T1	27,4	°C	Pass
84	18/7/2017	1:58:26	T1	27,3	°C	Pass
85	18/7/2017	3:54:48	T1	27,3	°C	Pass
86	18/7/2017	5:51:10	T1	27	°C	Pass

<b>87</b>	18/7/2017	7:47:32	T1	27	°C	Pass
<b>88</b>	18/7/2017	9:43:54	T1	27,1	°C	Pass
<b>89</b>	18/7/2017	11:40:16	T1	27,1	°C	Pass
<b>90</b>	18/7/2017	13:36:38	T1	27,2	°C	Pass
<b>91</b>	18/7/2017	15:33:00	T1	26,9	°C	Pass
<b>92</b>	18/7/2017	17:29:22	T1	27	°C	Pass
<b>93</b>	18/7/2017	19:25:44	T1	27,1	°C	Pass
<b>94</b>	18/7/2017	21:22:06	T1	27,2	°C	Pass
<b>95</b>	18/7/2017	23:18:28	T1	26,9	°C	Pass
<b>96</b>	19/7/2017	1:14:50	T1	26,9	°C	Pass
<b>97</b>	19/7/2017	3:11:12	T1	26,9	°C	Pass
<b>98</b>	19/7/2017	5:07:34	T1	26,9	°C	Pass
<b>99</b>	19/7/2017	7:03:56	T1	23,9	°C	Pass



**Anexo F.** Certificado de LAS estándar de 60 mg/l.

HACH COMPANY

**HACH**

An ISO 9001 Certified Company

16 Botha Street  
Penrose, Auckland  
887 Tel: +64 9 5790141

S2

**Certificate of Analysis**

Page 1

COMMODITY: Detergents Standard Solution Ampule 60 mg/L as LAS  
COMMODITY NUMBER: 14271-10 MANUFACTURE DATE: 11/11/2016 DATE OF ANALYSIS: 11/11/2016  
LOT NUMBER: A6300

TEST	SPECIFICATIONS	RESULTS
Concentration: 60 mg/L as detergents.	56.4 to 63.6 mg/L	59.90 mg/L

The expiration date is Oct 2018


The molecular weight of the LAS standard solution, Cat. No. 14271-10 is 342 g/mol.

Certified by Scott Als

Scott Als  
Analytical Services Chemist

**Anexo G.** Certificado de la cepa de referencia certificado ATCC 25922 de *E. coli*.


HR-5  
26-01-16



**Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release**

<b>Specifications</b> Microorganism Name: <i>Escherichia coli</i> Catalog Number: 0335 Lot Number: 335-163 Reference Number: ATCC® 25922™ <sup>(1)</sup> Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 4	<b>Expiration Date:</b> 2017/6/30 <b>Release Information:</b> <b>Quality Control Technologist:</b> Tracy A Blenker <b>Release Date:</b> 2015/7/16
--	--

<b>Macroscopic Features:</b> 2 colony types, both are gray & beta hemolytic; one is circular to irregular, convex, slightly erose edge & smooth; other is larger, irregular, low convex, erose edge & rough	<b>Performance</b> <b>Medium:</b> SBAP
<b>Microscopic Features:</b> Gram negative straight rod	<b>Method:</b> Gram Stain (1)
<b>ID System:</b> Vitek GN (1) See attached ID System results document.	<b>Other Features/ Challenges: Results</b> (1) Oxidase(Kovacs): negative Beta-glucuronidase (E. coli Broth w/MUG): positive (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 16 - 22 mm (1) Gentamicin (10 mcg - Disk Susceptibility): 19 - 26 mm (1) SXT (1.25/23.75 mcg - Disk Susceptibility): 23 - 29 mm

  
Brad Goskowitz, President  
AUTHORIZED SIGNATURE

Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

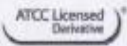

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.

(1) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiology, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.

  
  
TESTING CERT #2655.01

**MEDIBA-INC S.A.**  
Distribuidor para el Ecuador de  
**MICROBIOLOGICS**  
Registro Sanitario: A-541-04-13

© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303      Page 1 of 1      DOC.286

## **1. OBJETO**

Este instructivo describe la sistemática empleada en AQLAB para determinar la biodegradabilidad de MBAS, con el método de Prueba Presuntiva acorde a la norma ASTM D2667 y la norma ASTM D2330.

## **2. ALCANCE**

El método de Prueba Estándar para Biodegradabilidad de Alquilbencenosulfonatos, es un método aplicable para la determinación del grado de Biodegradabilidad de los alquilbencenosulfonatos. En muestras de detergentes líquidos, granulados y en barra.

El rango de trabajo comprende los niveles de porcentajes:  $\geq 90\%$  biodegradable, 80-90% medianamente biodegradable,  $\leq 80$  inadecuadamente biodegradable.

## **Interferencias**

Se producen interferencias positivas por todas las demás especies de Sustancias Activas para el Azul de Metileno (SAAM) presentes; si se busca una determinación directa de cualquier especie individual de SAAM, tal como Alquil Sulfonato Lineal (LAS), todos los demás interfieren. Sustancias tales como sulfonatos, sulfatos, carboxilatos y fenoles orgánicos, y tiocianatos, cianatos, nitratos y cloruros inorgánicos pueden también transferir más o menos azul de metileno a la fase cloroformo. Cuanto más pobre la extractibilidad de sus pares iónicos, más efectiva es la etapa de lavado en contracorriente acuosa para extraer estas interferencias positivas; la interferencia del cloruro es eliminada casi por completo y la del nitrato también lo es en gran medida por la contracorriente. Debido a la variada extractibilidad de SAAM no surfactantes desviaciones en la proporción de  $\text{CHCl}_3$  y en el procedimiento de lavado en contracorriente pueden inducir diferencias significativas en las SAAM totales observadas, aunque la recuperación de los surfactantes de tipo sulfonato y sulfato serán sustancialmente completas en todos los casos.

Interferencias negativas pueden ser consecuencia de la presencia de surfactantes catiónicos y otros materiales catiónicos, tales como aminas, porque compiten con el azul de metileno en la formación de pares iónicos. La materia en partículas puede producir interferencia negativa por la adsorción de las SAAM. Aunque alguna SAAM adsorbida puede desadsorberse y emparejarse durante las extracciones de  $\text{CHCl}_3$ , la recuperación puede ser incompleta y variable.

Redúzcanse al mínimo las interferencias debida a los materiales no surfactantes por cancelación, si es necesario (sección 5540). Otras contramedidas no son estándar. Elimínense los surfactantes catiónicos que interfieren y otros materiales catiónicos bajo condiciones adecuadas. Manipúlese la adsorción de los SAAM por partículas, preferiblemente filtrando y analizando las insolubles. Con o sin filtración, las SAAM adsorbidas pueden ser desadsorbidas por hidrólisis acida; sin embargo, la SAAM originada en cualquier surfactante de tipo éster sulfato presente es destruida a la vez. Los sulfuros, a menudo presentes en las aguas residuales sin tratar u ordinariamente tratadas, pueden reaccionar con azul de metileno para formar un producto de reducción incoloro, haciendo posible el análisis. Elimínese esta interferencia mediante oxidación previa con peróxido de hidrogeno.

### 3. REFERENCIAS

PG-AQLAB-01. Procedimiento General para la Elaboración de Documentos.

NTE INEN 842, Agentes Tensoactivos, Requisitos

ASTM D26667. Standard Test Method for Biodegradability of Alkylbenzene Sulfonates

ASTM D2330 Standard Test Method for Methylene Blue Active Substances

Standard Methods for the Examination of water and Wastewater APHA 22th. Edition. 2012.

SM5540C, Surfactantes Anionicos como SAAM.

ITU-AQLAB-01. Instructivo Técnico de uso de equipo UV/Vis.

ITO-AQLAB-01. Instructivo operativo de toma de muestra

### 4. DESCRIPCIÓN

#### 4.1. Equipos y Materiales

- Estufa de incubación EMB/033
- Esterilizador EMB/046
- Mecheros de Bunsen
- Tubos de ensayo tapa rosca (50ml)
- Pipeta automática de 1 ml MV/024
- Asa de platino
- Puntas estériles de 1ml
- Agitador vortéx EMB/032

- Espectrofotómetro a una longitud de onda de 652 nm y celdas de 1 cm de longitud del paso del haz de luz. EFQ/014
- Balanza analítica. EFQ/006
- Probetas MV/31
- Agitador magnético. EFQ/013
- Frascos para incubación de 500 ml
- Balones aforados 1000 ml MV/008, 500 ml MV/007, 250 ml, 100 ml, 50 ml.
- Embudos de separación de 500 ml. MA/035
- Balón de aforo de 25 ml. MV/003
- Balones de aforo de 100 ml MV/005

## **4.2. Realización**

### **4.2.1 Incubación**

- Añadir 80 ml de medio de cultivo más 20 ml de solución MBAS, en los frascos de incubación.
- Utilizar un frasco para cada tensoactivo que se esté ensayando, más un matraz de control para LAS y un matraz en blanco, que contenga todos los componentes del medio basal pero sin tensoactivo.
- Utilizando el inóculo microbiano de la cepa ATCC 25922 (*Escherichia coli*), inocule los frascos. Utilice el mismo inóculo para todos los frascos incluyendo el control y el blanco. Utilice 1 ml de inóculo.
- Colocar los frascos que contienen medio de cultivo, tensoactivo e inóculo en una máquina de agitación que produzca aireación y mezcla aceptables para la biodegradación. Mantener la temperatura del contenido del matraz a  $25 \pm 3$  (22-28) °C y, si es necesario, ajustar el pH del medio al comienzo de cada período de incubación a un pH de 6 a 8.

### **4.2.2. Preparación de la curva de calibración:**

Realizar la curva con los siguientes estándares: blanco, 0,00; 0,1; 0,3; 0,5; 1; y 2 mg/l a partir de una solución madre de alquil sulfonato lineal de concentración equivalente a 60 mg/l de la cual se toma 5 ml con una pipeta volumétrica y se afora a 100 ml dando una concentración de 6 mg/l, equivalente a LAS, de la cual se prepara soluciones con diferentes concentraciones.

A partir de la solución estándar de :	CONCENTRACIÓN FINAL	ml de Solución estándar y aforar a 100 ml con agua destilada
	0 mg/L	0 ml
6 mg/L	0,1 mg/L	1,67 ml
6 mg/L	0,3 mg/L	5,00 ml
6 mg/L	0,5 mg/L	8,33 ml
60 mg/L	1 mg/L	1,67 ml
60 mg/L	2 mg/L	3,33 ml

Una vez ajustado el equipo de UV-VIS, se elabora la curva de calibración; empieza por el blanco y trabaje hacia delante, hasta el estándar de alta concentración.

#### 4.2.3. Extracción de Alquil Sulfonato Lineal (LAS)

- Colocar 100 ml de la muestra, estándar y blanco en una probeta limpia de 250 ml.
- Añadir la muestra en el embudo de separación limpio de 500 ml. (Ayúdese de un soporte de apoyo).
- Añadir 3 gotas de fenolftaleína y añadir suficiente solución de NaOH para producir un color rosa.
- Añadir suficiente solución diluida de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.7% v/v), para que el color rosa desaparezca.
- Añadir 25 ml de solución de azul de metileno en el embudo, tapar el embudo y agite suavemente.
- Añadir 50 ml de cloroformo en el embudo, tapar el embudo y agite suavemente durante 30 segundos, eliminar la presión del embudo abriendo la llave del mismo con dirección hacia arriba.
- Añadir 50 ml de solución de lavado de fosfato a los extractos combinados de cloroformo en el embudo de separación.
- Agite vigorosamente por 30 segundos. Deje sedimentar durante un minuto.
- Filtre la capa de cloroformo a través de un filtro en un balón de 100 ml.
- Repetir la extracción. Añada 25 ml de cloroformo al embudo de separación, agite y deje sedimentar.
- Extraiga la capa de cloroformo a través de un filtro en el balón de 100 ml.
- Añadir cloroformo adicional en el embudo según sea necesario y repetir la extracción para llevar el matraz al balón de 100 ml.

- La absorbancia del azul de metileno extraído debe medirse 30 min después de la extracción.

#### 4.2.4. Tratamiento de resultados

Registrar en el protocolo ITE3501 Formato para la Determinación de Biodegradabilidad de MBAS, el valor de la lectura del equipo en concentración, el código de la muestra y considere el factor de dilución si aplica.

Para la determinación del porcentaje de biodegradabilidad del detergente considerar la siguiente fórmula, según el ASTM D2667:

$$\% \text{ Eliminación Día } x = \frac{(S_o - B_o) - (S_x - B_x)}{S_o - B_o} \times 100$$

Dónde:

$S_o$  = Análisis de cultivos tensoactivos de ensayo inicial

$S_x$  = Análisis de cultivos tensoactivos de ensayo a x días,

$B_o$  = Análisis de cultivos en blanco de ensayo inicial,

$B_x$  = Análisis de los cultivos en blanco de ensayo a x días.

Expresada como concentraciones de MBAS, mg / l.